THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie moléculaire
Présentée par :

Meg ROUXEL

****

Biopréservation de matrices lactées par des ferments bactériens

****

Directeur de Thèse : Jean –Marc BERJEAUD
Co-directeurs de thèse : Willy AUCHER & Julien VERDON

****

Soutenue le 4 octobre 2019
devant la Commission d'Examen

****

JURY

Rapporteurs :

REVOL-JUNELLES Anne-Marie	Professeur, Université de Lorraine
ZAGOREC Monique	Directrice de recherche, INRA, Nantes

Examinateurs :

BRAQUART VARNIER Christine	Professeur, Université de Poitiers
SCHLUSSELHUBER Margot	Maitre de conférences, Université de Caen
BERJEAUD Jean-Marc	Professeur, Université de Poitiers
AUCHER Willy	Ingénieur de recherche, CNRS, Poitiers

“Alone, we can do so little, together we can do so much”

- Helen KELLER

Cette thèse CIFRE a été financée par l'entreprise BIODIS, dédiée à la commercialisation des ferments produits par l'entreprise BIOPROX, et réalisée dans le laboratoire UMR CNRS 7267 Ecologie et biologie des interactions (EBI) équipe microbiologie de l'eau (MDE) de l'université de Poitiers. Elle s'intégre dans le projet BIOPRES, visant à améliorer la gamme de biopréservation de l'entreprise BIOPROX.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail : **Anne-Marie REVOL-JUNELLES**, professeur à l'Université de Lorraine, **Monique Zagorec**, Directrice de recherche à l'INRA de Nantes, **Christine BRAQUART VARNIER**, Professeur à l'Université de Poitiers et **Margot SCHLUSSELHUBER**, Maitre de conférences à l'Université de Caen.

Je tiens également à remercier les directeurs du laboratoire EBI qui se sont succédé pour m'avoir accueilli durant ces trois années : **Didier BOUCHON** et **Jean-Marc BERJEAUD**. Je remercie également **Marie-Hélène RODIER**, responsable de l'équipe MDE, de m'avoir accueilli dans son équipe. Votre bienveillance et votre humour ont su me redonner le sourire en toutes circonstances, l'équipe MDE a de la chance de vous avoir.

Je tiens de nouveau à remercier **Jean-Marc** pour ces quatre années dans l'équipe MDE. Vous m'avez accueillie lors de mon master 2 et vous m'avez fait confiance pour cette thèse. Ça a été un grand plaisir de travailler avec vous. Vous avez su être toujours disponible, patient, positif et bienveillant à mon égard. Je ne compte pas le nombre de fois où vous avez su me rassurer et me remotiver quand il le fallait. Merci pour tout (excepté mon magnifique surnom), si j'en suis là c'est grâce à vous. Merci aussi à la SNCF qui vous a permis de relire une partie de ce manuscrit tranquillement.

Un grand merci à **Willy** d'avoir accepté d'encadrer ma thèse. Tu t'es impliqué dans ce travail et tu n'as rien lâché. Tu as su être toujours disponible face à mes nombreuses questions et toujours à l'écoute. Ces derniers mois ont été denses mais tu m'as aidée et soutenue jusqu'au bout, encore merci.

Merci à **Julien** sans qui je ne serais jamais venue sur Poitiers (finalement je ne sais pas si c'est un cadeau…). L'accueil de Breton n'a pas été facile pour toi, et les conflits entre les pains aux chocolats et les chocolatines perdurent. Mais tu n'as pas été si traumatisé puisque tu as accepté de faire partie de l'encadrement de cette thèse. Merci pour ton écoute et ta bonne humeur durant quatre ans.

Merci à l'équipe de BIOPROX pour avoir aidé à monter ce projet : **Carmen LAPADATESCU** sans qui cette thèse n'aurait pu commencer, **Philippe BLANC**, **Romuald VÉNIANT** et **Pierre MARCHAND** pour leurs précieux conseils et leur disponibilité. Merci également d'avoir pris le temps de m'acceuillir pour m'enseigner votre savoir faire.

Merci à **Thierry** pour m'avoir enseigné l'art de l'analyse des acides gras et de m'avoir permis d'analyser mes échantillons dans son laboratoire. Un immense merci à **Leslie** pour sa grande patience et son temps lors des analyses en GC-MS. Tu auras été d'une aide précieuse lors de cette fin de thèse, relativement intense en manips.

Dans la fameuse aile A, je remercie chalereusement **Laurence** et **Sylvie** pour tout le temps qu'elles m'ont consacrée face aux nombreuses questions administratives. Merci d'avoir toujours pris soin de passer mes commandes au plus vite, de m'avoir recherchée les meilleurs hôtels et vols lors de mes déplacements. Merci également de votre bonne humeur communicative. Le laboratoire ne pourrait pas se passer de vous deux.

Merci à **Alex** pour m'avoir fait confiance en enseignement. Grâce à toi j'ai eu le plaisir de donner mes premiers cours, c'est une expérience que je ne suis pas prête d'oublier. Merci également pour les nombreuses idées de séries et films qui auront su m'occuper.

Toujours dans l'aile A, je souhaite remercier chaleureusement **Christophe** pour tout le temps qu'il m'aura accordé, notamment pour m'aider à couler mes milieux de culture, mais aussi pour être venu à mes présentations. Tu souhaites toujours faire plaisir aux membres de ce laboratoire, merci pour les bonbons et nombreuses patisseries. Merci également à **Dominique** pour l'aide précieuse que tu nous as apportés à tous au laboratoire avant ton départ en retraite.

Même s'il ne fait pas partie de cette aile, c'est toujours là-bas que l'on croise **Daniel** (alias Dada). Merci pour les nombreux séquençages mais surtout pour cette bonne humeur, les nombreuses chansons et ce rire qui te caractérise si bien.

Dans l'aile B, je souhaite remercier **Yann**, seul Poitevin à admettre que oui, en Bretagne, il fait beau aussi ! Merci aussi à **Christine**, notamment de m'avoir ramenée en Terre sainte. Merci à **Marion** pour sa gentillesse. Je suis déçue de ne pas avoir pu t'écouter jouer du violon plus longtemps en juin dernier. Merci également à **Ascel** pour la bonne humeur, je ne me remets toujours pas de t'avoir vu danser et chanter sur la Champions League de MHD, un grand moment !

Merci à l'amateur de pizza mais néanmoins sensible à la chaleur **Vincent D** pour les nombreux conseils mais aussi pour les fous rires. Tu as toujours le mot pour redonner le sourire et ta bonne humeur est communicative. Merci à **Cyril**, devenu Breton, à qui je souhaite le meilleur à Brest.

Merci à **Stéphanie**, l'une des personnes les plus attentionnées que j'ai pu rencontrer. Mes «plats» (ou plûtot ceux de Benoit) sont devenus plus relevés grâce à tes nombreuses épices. Merci de vouloir toujours faire plaisir aux autres et d'être autant investie au laboratoire. Il n'a jamais aussi bien fonctionné que depuis que tu es là. Merci également à **Anne** pour son écoute et ses nombreuses patisseries mensuelles.

Je tiens à remercier chaleureusement les doctorants, post-doctorants, ingénieurs et stagiaires avec qui j'ai eu la chance de passer des moments inoubliables durant toutes ces années.

Un immense merci à **MH** d'avoir toujours été à mes côtés pour me soutenir dans les bons comme dans les mauvais moments. Je l'avoue enfin, le magnifique pyjama intégral licorne est un cadeau de ma part… j'espère qu'il aura su te tenir chaud l'hiver dernier avec tes magnifiques chaussons flamants rose. Je te souhaite le meilleur car ne l'oublie jamais, tu es une fille géniale.

Merci à mon voisin trop cool, **Clément**, chez qui il faut aller vérifier que tout va bien pour rassurer Annie. Merci d'avoir toujours été là, pour notre humour un peu nul qu'on a malheureusement en commun, pour les nombreux repas, soirées jeux, barbecue parking et toutes ces fois où tu m'as ramenée en chantant Wonderwall (très faux d'ailleurs, il faut que je te l'avoue). Je te souhaite tout le meilleur du monde

avec Gertrude (même si je l'ai sentie délaissée à l'arriver de Gloria), c'est une plante géniale, ne la laisse pas seule dans le noir.

Merci à **Florine**, l'amoureuse de poissons à ses heures perdues, pour toutes ces nombreuses discussions. Merci de m'avoir supporté quand je n'allais pas bien et de m'avoir toujours écoutée et rassurée quand j'en avais besoin. Le flambeau de l'HPLC est désormais passé, à toi d'en faire bon usage. De grands pouvoirs impliquent de grandes responsabilités !

Le temps est bon… le ciel est bleu…tu t'es reconnu ? Oui oui **Vincent R**ochette c'est bien de toi qu'il s'agit. Je dois admettre que depuis ton départ, chanter faux dans le labo pour embêter les gens et leur mettre des musiques nulles dans la tête ce n'est plus pareil. Merci pour ces fous rires et merci à **Julie** pour tous les bons moments, les gauffres du dimanche, les apéros et soirées raclettes. Vous êtes retournés en Terre sainte, et vous avez eu raison !

Merci à Chaton, Félix, le blond, **Aurel** (du futur ou du passé) pour l'âme d'enfant qu'il a gardé. Merci pour toutes ces chansons NULLES (la marche des éléphants…), ces journées NULLES, ces blagues NULLES partagées dans le bureau. Merci pour toutes ces madeleines envoyées sur ma tête quand j'avais faim (à défaut d'une balle rouge) et tous ces blocages sur les « UIIII » et « wuiiiik-end ». Désolé de ne pas pouvoir partager ta passion pour la bicyclette, j'ai essayé !

Merci à **Yoann** pour m'avoir montré l'importance de la sauvegarde d'un disque dur à ses dépends. Cette histoire s'est bien finie, on peut en rire maintenant ! Désolé ne pas avoir pu continuer à m'occuper de certaines de tes conjugaisons, mais je peux toujours t'enregistrer un tuto ! Merci également à **Léna** de te remettre dans le droit chemin, je vous souhaite le meilleur pour votre nouvelle vie sur Poitiers.

Merci à **Aziz** d'avoir supporté mes dernières crises de folies lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci d'avoir toujours voulu m'aider avec de nombreux logiciels dont j'ai déjà oublié les noms. Je suis un cas désespéré concernant l'informatique, ce n'est pas de ta faute.

Un grand merci à **Camille** d'avoir pris autant de temps pour m'aider lors de son ATER. Merci de m'avoir appris à utiliser les appareils de biochimie, d'avoir subi mes questions nulles et de m'avoir autant écoutée quand j'en avais besoin. Ton départ du labo a laissé un grand vide et c'est toujours un plaisir de te revoir ainsi que ta famille. Je vous souhaite le meilleur pour tous vos projets.

Merci à **Marie-Laure** et **Thomas** pour tous ces moments partagés et ces fous rires lors de votre passage à Poitiers. Pour ces soirées jeux avec Roselyne Sanchez (que vous avez martyrisé), les mythiques « va s'y là », « On t'attend là » où encore « tu gaches les vacances de tout le monde », les performances de compétiteurs sur vélo et les spécialités culinaires. Merci de m'avoir montré les dangers des collections, j'en ai pris note pour mon déménagement.

Merci au rayon de soleil du laboratoire, **Luce**, pour son sourire, sa positivité, sa bienveillance et sa gentilesse. Tu m'auras appris à tchiper même si depuis que tu es partie à Tours j'ai tout perdu ! Merci pour ces fous rires, ces covoiturages et ton franc parlé, tu auras illuminé mes journées.

Merci à mon petit bouchon, le T-rex, **Manon**, qui a été la meilleure stagaire que j'ai pu accompagner. Merci pour ces six mois et de tout l'investissement que tu as pu donner dans ce projet. Tu es une personne extraordinaire qui a illuminé ces derniers mois difficiles. Le flambeau des yaourts est passé, tu pourras faire tes propres tutos. Cependant, personne n'est parfait. OUI cette personne mange ses céréales avec… du jus d'orange !

Merci aux couple mythique les Mimis, alias **Antoine** et **Charlène**, pour leur sens de l'organisation de week-end réussi (Ile de Ré et Mont Dore). Cependant, je ne referai plus jamais les courses avec toi Antoine, tu m'as traumatisée ! Merci de m'avoir remis au sport, ça m'a fait le plus grand bien durant ces trois ans. Merci Mimie pour ce fou rire à Mendes France et cette chûte magnifique à cause de cette tongue. J'en rigole encore en écrivant ces mots. Je vous souhaite le meilleur pour votre petite famille qui s'agrandit.

Merci **Obélia**, de m'avoir attirée dans le mauvais chemin et d'être à l'origine de mes longues soirées au PLB (et donc des lendemains TRES difficiles). Tu as été d'un soutien inestimable et tu as toujours su me redonner le sourire. Merci d'être toi, d'être une personne si généreuse et à l'écoute avec les gens que tu aimes. Tu souhaites toujours faire plaisir aux gens et j'ai eu la chance d'être sur ton chemin. Certes, grâce à toi je suis devenue Lucy Liu, mais pour toutes tes qualités, je te pardonne. Je t'attends pour te faire visiter la Bretagne, avec un vélo gonflé cette fois !

Merci à **Seindé** (Alias Dédé) pour toute la bonne humeur et ce sourire qui la caractérise. Tes passages sur Poitiers ont été plus qu'appréciés et on aurait aimé t'avoir plus souvent avec nous (et faire plus de session shopping). Merci également à **Laettitia** pour ces derniers mois et cette bonne humeur que tu accompagnes partout avec toi.

Merci à tous les stagiaires avec qui j'ai passé de bons moments : **Marine V** et sa spontanéité, **Viriginie** et son bluff redoutable, **Thibauld** et ses talents de mimes, **Manon D** et ses gaffes, **Dahn** et le congélateur, **Sastine,** ses voisins fous et ses conseils de drague, **Morgane** et ses miaulements, **Julie** et son fameux steack haché chips, **Manon B** et ses extraits. Merci aussi à **Marion R** et son passage rapide mais agréable.

Merci aussi à **Emilie** qui a su m'écouter (de trop nombreuses fois) et m'écourager lorsque j'étais en M2. Te retrouver à l'AMP 2018 m'a fait très plaisir, à très bientôt en Bretagne ! Merci aussi à **Adélie** et **Konstantin** qui arrivent toujours à me faire sourire dans les couloirs de l'IBMIG ou au PLB.

Merci à toutes ces personnes qui n'ont pas compris ce que je faisais depuis presque 4 ans sur Poitiers mais qui ont toujours été là. Grâce aux personnes du BCP 86, j'ai pu évacuer et rire lors de nombreuses parties de badminton. Mention spéciale à **Marine** et **Romain**, grâce à qui je suis devenue pilier du PLB.

Merci à mes amies qui malgré les années sont toujours présentes et se moquent toujours autant de moi à mes dépends : **Clairette** (la Familia), **Lisa** (le petit rat battu), **Cécile** (et son American boy), **Céline** (et nos magnifiques danses), **Justine** (Ma box) et **Zénaïde** (Ma Bibi).

Merci à ma famille : **mes parents,** de m'avoir toujours encouragée à donner le meilleur de moi, à **ma sœur**, pour m'avoir redonné tant de fois le sourire avec ses blagues nulles, à **ma grand-mère, Nicole,** pour sa positivité et sa joie de vivre car cette thèse c'était « hard de ouf », à **mes grand-parents**, **Christiane** et **Gérard**, pour leur courage face aux évenements. Et à ces personnes à qui j'aurais aimé montrer cette thèse : mon **grand-père, Joseph,** et **Fernande**.

Enfin, merci à **Benoit**, à mes côtés depuis 8 ans, qui a compris pourquoi je devais m'éloigner de la Bretagne pendant 4 ans, qui m'a toujours soutenue et qui a toujours cru en moi dans tout ce que j'ai entrepris. Mille mercis, Je t'aime.

P.S: Comment ça ? J'ai oublié quelqu'un ? Aaha tu t'es reconnu ? As-tu compté le nombre de personne avant toi comme tu le fais toujours ? C'est bien de toi dont je parle **Steven ROLLAND** ! Il fallait bien que je t'embête encore une fois. Je dois bien l'avouer, cette thèse n'aurait pas été aussi animée sans toi et tes jeux de mots pourris (allons faire un tour à Tours), les nombreuses parties de badminton, les nombreuses bières (pilier du PLB), et sans compter ce magnifique séjour à Glasgow où on a du se supporter, MAMAMIA ! Malgré tout, comme les autres le disent si bien, tu es vraiment attachiant…Bon courage pour ta dernière ligne droite.

Abréviations

Cm: Chloramphénicol

DO: densité optique

EFSA: Autorité européenne de sécurité des aliments (*European Food Safety Authority*)

Erm: Erythromycine

FDA: Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*)

GC: Chromatographie en phase gazeuse (*Gaz Chromatography*)

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)

GRAS: Généralement reconnu comme sûr (*Generally Recognized As Safe*)

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance (*High Pressure Liquid Chromatography*)

HSSE : Extraction par sorption sur barreau magnétique (*Head-Space Sorptive Extraction*)

LAB: Bactéries lactiques (*Lactic Acid Bacteria*)

MRS: deMan, Rogosa, Sharpe

MLST: Typage de séquence multilocus (*MultiLocus Sequence Typing*)

LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*chromatography-mass spectrometry*)

QPS: Présomption qualifiée de sécurité (*Qualified presumption of safety*)

QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe

RPM : Tour par minutes

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SGC : Sabouraud glucose agar

SPE : Extraction en phase solide (*Solid Phase extraction*)

SPME : Micro-extraction en phase solide (*Solid Phase MicroExtraction*)

UFC: Unité formant colonie

YNB: Yeast nitrogen base

YPD: Yeast Peptone Dextrose

YM: Yeast Malt

Sommaire

I – Problématique 1

II – Généralités 6

A. Les contaminants fongiques 7

1. Origine..... 8

a. La matière première..... 8

a.1 Le lait..... 8

a.2 Autres ingrédients 8

a.3 Ingrédients technologiques : cas de la saumure 9

b. L'environnement de transformation..... 9

c. Chez le consommateur 10

2. La contamination par les levures..... 11

a. Le genre *Candida* 11

b. Le genre *Rhodoturula* 11

c. *Yarrowia lipolytica*..... 12

d. Autres genres 13

3. La contamination par les moisissures 13

a. Le genre *Penicillium* 13

b. Le genre *Aspergillus* 15

c. Autres genres 15

B. La biopréservation 16

1. Les bactéries lactiques..... 16

a. Le genre *Lactococcus*..... 19

b. Le genre *Lactobacillus*..... 22

b.1 Généralités..... 22

b.2 Activité antifongique 25
b.2.1 Activité en milieu de laboratoire 25
b.2.2 Activité en matrice laitière 25
c. Autres genres 29
c.1 Le genre Pediococcus 29
c.2 Le genre Leuconostoc 29
2. Critères de sélection des organismes bioprotecteurs 30
a. Criblage de souches d'intérêts 30
b. Innocuité des souches 31
c. Contraintes industrielles 32
C. Activité antifongiques des bactéries lactiques 33
1. Les acides organiques 34
a. L'acide lactique 34
b. L'acide acétique 35
c. L'acide propionique 36
d. Acides dérivés d'acides aminés 37
d.1 Acide phényllactique et Acide 4-hydroxy-phényllactique 37
d.3 Acide benzoïque 39
e. Les acides gras 41
e.1 Acides gras saturés 41
e.2 Acides gras insaturés 42
e.3 Acides gras hydroxylés 42
2. Les composés peptidiques 43
a. Peptides isolés en milieu MRS 43
b. Peptides isolés en matrices laitière 44
c. Les dipeptides cycliques 45

3. Autres composés 48
a. Le diactéyle 48
b. La reuterine 49
c. Les lactones 49
4. Mécanismes d'action 50
5. Mécanismes de résistance des levures 52
D. Méthodologie de caractérisation des molécules antifongiques des LAB 56
1. Schéma général 56
2. Analyse des acides organiques majoritaires 57
3. Identification des molécules antifongique 57
a. Extraction en phase solide (SPE) 58
b. Extraction liquide-liquide 59
b.1 Analyse d'acides organiques : acétate d'éthyle 59
b.2 Analyse d'acide gras : chloroforme ou hexane 60
b.3 Extraction des composés volatiles ou semi-volatiles 61
III – Matériels et méthodes 62
A. Souches microbiennes et milieux de culture 63
1. Souches de LAB étudiées et conditions de culture 63
2. Souches de moisissures étudiées 65
3. Souches de levures étudiées 65
B. Criblage de l'activité antifongique des souches de LAB 66
1. Activité anti-moisissures 66
2. Activité anti-levures 66
C. Caractérisation de l'activité antifongique 67
1. Préparation des surnageants de cultures 67
2. Test d'activité des différents surnageants de culture 67

a. Test qualitatif 67
b. Test quantitatif 67
3. Activité en challenge test 68
D. Caractérisation des molécules actives 69
1. Nature des molécules actives 69
2. Fractionnement des molécules du surnageant par SPE 70
3. Dosage des acides « majoritaires » : acides lactique et acétique 70
4. Dosage d'acides organiques minoritaires : Approche QuEChERS-LC-MS ... 71
a. Extraction des acides organiques par QuEcHERS 71
b. Préparation des standards 71
c. Analyse des extraits par LC-MS 72
5. Recherche de peptides actifs 73
6. Analyse des acides gras 73
7. Analyse des molécules volatiles 74
E. Accroissement de la production de molécules antifongiques par mutagénèse aléatoire 75
1. Mutagénèse par irradiation UV 75
2. Mutagénèse par transposition 76
a. Par les plasmides pVI129 et pVI110 76
b. Par le plasmide pPH-M1 77
c. Transformation de souches de lactobacilles 78
c.1 Protocole 1 (Licandro-Seraut et al., 2012) 78
c.2 Protocole 2 (De Keersmaecker et al., 2006) 79
c.3 Protocole 3 (Palomino et al., 2010) 79
c.4 Protocole 4 (Landete et al., 2014) 80
c.5 Vérification du curage du plasmide pVI129 81

3. Criblage de souches surproductrices 81
a. En milieu MRS 81
b. En milieu lait 81
IV - Résultats et discussion 83
A. Caractérisation de souches actives 84
B. Nature des molécules antifongiques produites 91
C. Analyse de l'activité des souches en MRS..... 94
1. Milieu MRS-Glc 94
a. Population finale 94
b. Activité antifongique..... 96
c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC 97
2. Milieu MRS-Lac..... 101
a. Population finale 101
b. Activité antifongique..... 104
c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC 105
3. MRS-sAc 107
a. Population finale 107
b. Activité antifongique..... 109
c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC 110
4. Recherche d'acides organiques minoritaires en MRS-Glc et MRS-Lac ... 112
5. Surproduction d'acide phényllactique et d'(S)-2-hydroxyisocaproïque en MRS-Glc..... 118
a. Surproduction chez la souche *L. casei* 7006 118
b. Surproduction chez la souche *L. paracasei* 6363 121
D. Caractérisation et activité des souches en milieu lait..... 124
1. Population finale..... 124

2. Activité antifongique 126
3. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC 127
4. Recherche d'acides organiques minoritaires 129
5. Surproduction d'acide phényllactique et (S)-2-hydroxyisocaproique en lait 133
E - Analyse du potentiel de biopréservation en challenge test 135
1. Croissance des ferments de biopréservation 136
2. Activité antifongique 137
3. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC 138
4. Recherche d'acides organiques minoritaires 140
5. Recherche de molécules peptidiques actives 146
6. Recherche d'acides gras actifs 147
7. Recherche de molécules volatiles actives 156
F - Obtention de mutants surproducteurs ou non-producteurs de molécules antifongiques par mutagénèse aléatoire 160
1. Mutagenèse par irradiation UV 160
2. Mutagénèse par transposition 163
a. Système pVI129-pVI110 (Licandro-Serrault *et al.,* 2012) 165
b. Système pPH-M1 167
3. Mise au point d'un test de criblage de mutants en matrice lactée 167
VI- Conclusion et perspectives 171
A. Mise en évidence du potentiel de la souche *L. casei* 7006 172
B. Vérification de l'innocuité de la souche *L. casei* 7006 174
C. Molécules antifongiques produites en challenge tests 174
D. Perspectives 176
1. Confirmation du rôle du diacétyle 176
2. Interactions intra et inter-espèces 178

3. Mise au point d'un criblage de souches surproductrices de molécules antifongiques 180

VII - Références bibliographiques.....182

VIII- Annexes.....214

Table des figures

Figure 1 : Contamination d'un yaourt par *R. mucilaginosa* 12

Figure 2 : Contamination d'un yaourt par *P. chrysogenum* 14

Figure 3 : Schéma récapitulatif de la fermentation lactique des LAB par différentes voies (Issu de Bosma *et al.,* 2017). 17

Figure 4 : Arbre phylogénétique non raciné des différents genres de LAB, comprenant également d'autres *Firmicutes* aérobies et anaérobies (surlignage bleu) (Lahtinen *et al.,* 2012)..... 18

Figure 5 : *Lactococcus lactis* JCM 5805 observé en microscopie électronique à balayage **(Nomura *et al.,* 2009)** 19

Figure 6 : Voie métabolique du citrate et production du diacétyle à pH acide (5.5) par *Lactococcus* bv. diacetylactis CRL264 (proposé par **García-Quintáns *et al.,* 2008**) 21

Figure 7 : *Lactobacillus casei* Shirota observée par microscopie électronique à balayage (x10 000) **(Liew *et al.,* 2018)**..... 22

Figure 8 : Arbre phylogénétique de 174 espèces de *Lactobacillus* et de *Pediococcus* basé sur les séquences protéiques de gênes à copie unique du pangénome **(Zheng *et al.,* 2015)**. 24

Figure 9 : Structures chimiques de divers composés anti-fongiques retrouvés dans les surnageant de LAB **(Siedler *et al.,* 2019)**. 34

Figure 10 : Représentation schématique de l'acide lactique..... 35

Figure 11 : Représentation schématique de l'acide acétique..... 36

Figure 12 : Représentation schématique de l'acide propionique 37

Figure 13 : Représentation schématique de l'acide phényllactique (A) et de l'acide 4-hydroxyphényllactique (B). Schéma de biosynthèse de ces deux acides, lié à la fermentation du glucose et au catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine, (issus de **Dao *et al.,* 2019**) (C) 38

Figure 14 : Représentation schématique de l'acide benzoïque 40

Figure 15 : Biosynthèse de l'acide benzoïque par les LAB dans les produits laitiers (adapté de Sieber *et al.* 1995). 40

Figure 16 : Représentation schématique de l'acide (9Z, 12Z) -octadéca-9,12-diénoïque 42

Figure 17 : Représentation schématique de dipeptides cycliques : cyclo (L-Gly-L-Leu)(A), cyclo (L-Phe-L-Pro)(B), cyclo(L-Leu-L-Pro)(C), cyclo(L-Pro-L-Tyr)(D), cyclo(L-Pro-L-Val)(E) et la cyclo(L-pro-L-Pro)(F). 46

Figure 18 : Représentation schématique du diacétyle 48

Figure 19 : Représentation schématique du 3-hydroxypropionaldéhyde ou Reuterine 49

Figure 20 : Représentation schématique de la mévalonolactone (A) et de la δ -dodécalactone (B) 50

Figure 21 : Mécanismes d'action des composés produits pas les bactéries lactiques contre les levures (Siedler *et al.,* 2019). 52

Figure 22 : Modèle schématique de la réponse adaptative au stress acide chez la levure *S. cerevisiae* induit par l'acide acétique **(Palma *et al.* 2018)**. 54

Figure 23 : Modèle schématique de la réponse adaptative au stress acide chez la levure *Zygosaccharomyces bailii* induit par l'acide acétique **(Palma *et al.* 2018)**..... 55

Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de purification des molécules actives contenues dans le surnageant de culture des LAB. 57

Figure 25 : Représentation schématique du système permettant de générer la transposition aléatoire du plasmide pVI110 chez *L. casei* par l'expression de la transposase TpsaIS1223 portée par pVI129 (issus de **Licandro-serrault *et al.,* 2012**). 77

Figure 26 : Représentation schématique du vecteur pPH-M1 permettant de générer la transposition aléatoire du transposon Himar1Tn chez *L. reuteri* par l'expression inductible par la nisine de la transposase Himar 1C9 (issu de **Hemarajata *et al.,* 2014**) ; 78

Figure 27 : Croissance de la souche *P. chrysogenum* 3674 après 14 jours à 25°C sur gélose lait avec lactobacilles. Les géloses ont été inoculées au préalable avec la souche *L. rhamnosus* 5326 (++) (A) et la souche *L. paracasei* 6363 (-) (B). 86

Figure 28 : Croissance de la souche *C. intermedia* 3669 en surcouche sur une gélose MRS inoculée avec lactobacilles. Les souches striées en surface sont *L. rhamnosus* 5326 (++) (A) ou la souche *L. paracasei* 6363 (-) (B)..... 88

Figure 29 : Population finale en UFC/mL de milieu MRS (A) et pH final du milieu (B) (n=3). 95

Figure 30 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des surnageants de cultures de lactobacilles. (n=3)..... 96

Figure 31 : Détermination du temps de rétention des acides lactique (A) et acétique (C) par HPLC lors du passage sur colonne Aminex HPX-87H à 0,6 mL/min, détection à $\lambda_{210\ nm}$..... 98

Figure 32 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Glc après 24h de croissance (n=3). 100

Figure 33 : Population finale de six souches de lactobacilles en milieu MRS-Glc et MRS-Lac en UFC/mL (A) et acidification finale du milieu (B) (n=3). 103

Figure 34 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture, lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants issus des cultures de *Lactobacillus* en milieu MRS-Glc et MRS-Lac. (n=3) 104

Figure 35 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvés dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Lac et MRS-Glc après 24h de croissance (n=3)..... 106

Figure 36 : Influence de la présence d'acétate de sodium dans le milieu MRS-Glc sur la population finale de six souches de lactobacilles UFC/mL (A) et sur l'acidification finale de milieu (B) après 24h de croissance (n=3)..... 108

Figure 37 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants des cultures de lactobacilles en milieu MRS-Glc avec ou sans acétate de sodium (n=3)..... 109

Figure 38 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS avec ou sans acétate de sodium après 24h de croissance (n=3)..... 111

Figure 39 : Concentrations d'acide DL-p-hydroxyphénylactique (A), d'acide phénylactique (B) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (C) dosés en LC-MS dans les surnageants de lactobacilles en fin de culture (n=3). 117

Figure 40 : Concentrations d'acide lactique, dosé en HPLC (A), d'acide DL-p-hydroxy-phénylactique (B), d'acide phénylactique (C) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproique (D) dosés en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. casei* 7006 cultivée en milieu MRS supplémenté ou non avec 2 ou 20 g/L de phénylalanine (Phe) ou de leucine (Leu) (n=3). 119

Figure 41 : Croissance de *C. intermedia* 3669 exprimée en UFC/mL après 24h à 25°C en présence de différents volumes de surnageants de la souche *L. casei* 7006 cultivée en MRS supplémenté ou non en phénylalanine ou leucine (n=3). 120

Figure 42 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures de la souche *L. paracasei* 6363 en MRS supplémenté ou non avec 2 g/L de phénylalanine (Phe) et de leucine (Leu) (A). Concentrations d'acide lactique dosé en HPLC (B), d'acide (S)-2-hydroxyisocaproique (C) et d'acide phényllactique (D) dosés en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. paracasei* 6363 en MRS supplémenté ou non (n=3). 122

Figure 43 : Population finale de six souches de lactobacilles en UFC/mL (A) et pH final (B) après 24h de croissance en milieu MRS-Lac ou 72h en milieu lait (n=3). . 125

Figure 44 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures de lactobacilles en milieu MRS-Lac ou en milieu lait (n=3). 126

Figure 45 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Lac après 24h de croissance et en lait après 72h de croissance (n=3). 128

Figure 46 : Concentrations d'acide DL-p-hydroxyphénylactique (A), d'acide phénylactique (B) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (C) dosés en LC-MS dans les surnageants de *Lactobacillus* après 24h de culture en milieu MRS-Lac ou 72h en milieu lait (n=3). 131

Figure 47 : Concentration en acide phényllactique dosé en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. casei* 7006 après 24h de culture en milieu MRS ou 72h en milieu lait avec ou sans ajout de phénylalanine (A).Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures (MRS, milieu lait avec ou sans ajout de Phe) (B) (n=3). 134

Figure 48 : Nombre d'UFC/mL de lactobacilles contenus dans différents laits fermentés inoculés par ces mêmes souches suivies sur 21 jours à 22°C (J0 et J1) puis à 7°C (J14 et J21). 136

Figure 49 : Nombre d'UFC/mL de *C. lusitaniae* 3668 contenue dans les laits fermentés inoculés ou non par six ferments potentiels de biopréservation suivi sur 21 jours. 138

Figure 50 : Concentration d'acide lactique dosé au sein des différents laits fermentés par HPLC sur colonne aminex HPX-87 après 14 et 21 jours de stockage. 139

Figure 51 : Concentration en acide 2-hydroxyisocaproïque extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours. 142

Figure 52 : Concentration en acide phényllactique extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours. 143

Figure 53 : Concentration en acide benzoïque extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours..... 144

Figure 54 : Concentration d'acide 4-hydroxyphényllactique extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours. 145

Figure 55 : Tests d'activité des fractions protéiques isolées des petits laits des laits fermentés contenant la souche *L. rhamnosus* 5326 ou *L. casei* 7006..... 147

Figure 56 : Profils de séparation de 33 standards d'acides gras (de C4 à C24) en GC sur colonne Agilent HP-5. Séparation d'acide gras saturés (49453-U, C4 - C24 Even Carbon Saturated FAMEs, Sigma, USA) (A). Séparation d'un mélange contenant des acides gras saturés ou non (18919-1AMP, F.A.M.E. Mix, C4-C24, Sigma, USA) (B) Les numéros des pics correspondants sont présentés en tableau 16. 154

Figure 57 : Profils de séparation des extraits d'acides gras en GC sur colonne Agilent HP-5 issus de différents laits fermentés: sans ferment de biopréservation (A), avec la souche *L. casei* 7006 (B) et avec la souche *L. casei* 6960 (C)..... 155

Figure 58 : Analyse par SPME-GC-MS des molécules volatiles présentes dans les laits fermentés ne contenant pas de ferment de biopréservation (A), contenant la souche *L. casei* 7006 (B) ou la souche *L. casei* 6960 après un stockage pendant 21 jours à 7°C. 1 : diacétyle, 2 : acétoïne, 3 : acide acétique, 4 : 2,3-butanediol 157

Figure 59 : Détermination du temps de rétention du diacétyle (T = 4,7 min ; m/z :86) (1), de l'acétoïne (T= 12,7 min ; m/z : 88) (2), de l'acide acétique (T = 16.08 min ; m/z :60) (3) et du 2,3-butanediol (4)(T = 17.81 et 18.45 ; m/z : 57) par GC-MS sur colonne DB-WAX (30 m, 0.25 mm, 0.25µm)..... 158

Figure 60 : Droite étalon pour le dosage du diacétyle en SPME-GC-MS (Y= 118232*X + 490707 avec R^2 = 0.9984). 159

Figure 61 : voies de biosynthèse du diacétyle chez les bactéries lactiques (Issus de **Aunsbjerg *et al.*, 2015**). ALDC: α-acetolactate de-carboxylase, AR: Acetoin reductase..... 159

Figure 62 : Sélection des conditions d'irradiation UV permettant d'obtenir un abattement de 99,9% des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006..... 161

Figure 63 : Tests d'antagonisme de la souche *L. rhamnosus* 5326 sauvage, cultivée à 30°C (A), 37°C (B) ou 42°C (C), avant ajout de C. intermedia 3669 en gélose molle et incubation 25°C pendant 48h. 162

Figure 64 : Suivi de stabilité du plasmide pVI129 en milieu MRS après deux cultures successives. 166

Figure 65 : Test de criblage de souches antifongiques en gélose lait..... 170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Utilisation de *Lactococcus* en tant que ferment (à partir du Whitman, 2009). 20

Tableau 2 : Différentes espèces de lactobacilles possédant une activité antifongique sur milieu gélosé ou dans leur surnageant de culture en milieu MRS 26

Tableau 3 : Exemples de ferments de biopréservation de matrices lactées commercialisés à activité contre levures et moisissures contenant des *Lactobacillus* 28

Tableau 4 : Souches de lactobacilles étudiées et leur origine..... 63

Tableau 5 : Liste des différentes souches de moisissures utilisées 65

Tableau 6 : Liste des différentes souches de levures utilisées 65

Tableau 7 : Structure des 15 composés antifongiques recherchés par l'approche QuEChERS couplé à la LC-MS : 72

Tableau 8 : Activité inhibitrice des différents lactobacilles inoculés dans une gélose lait vis-à-vis de cinq souches de moisissures contaminantes des produits laitiers après 7 jours de croissance. 85

Tableau 9 : Activité inhibitrice des différents *Lactobacillus* inoculés sur une gélose MRS vis-à-vis de quatre souches de levures contaminantes des produits laitiers.... 87

Tableau 10 : Six souches sélectionnées pour l'étude 90

Tableau 11 : Effets de différents traitements biochimiques et physiques sur l'activité des surnageants de *Lactobacillus* contre la croissance de *C. intermedia* 3669..... 92

Tableau 12 : Activité des fractions des surnageants en milieu MRS des souches de lactobacilles *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 obtenues par SPE contre la croissance de *C. intermedia* 3669 (- : pas d'activité de la fraction, + : activité de la fraction, +/- : faible activité de la fraction). 93

Tableau 13 : Calibration du dosage en LC-MS de 15 molécules antifongiques (Adapté de **Brosnan *et al.,* 2012**) 114

Tableau 14 : Rendement d'extraction en milieu MRS de 15 molécules antifongiques (exprimé en pourcentage)..... 115

Tableau 15 : Rendement d'extraction en milieu lait de 15 molécules antifongiques connues 130

Tableau 16 : Rendement d'extraction en laits fermentés de 14 molécules antifongiques connues 141

Tableau 17 : Abondances relatives normalisées des acides gras retrouvés dans les laits fermentés sans ferment de biopréservation ou contenant les ferments *L. casei* 7006 et *L. casei* 6960. 150

Tableau 18 : Protocoles de transformations testés sur les différentes souches actives 163

Tableau 19 : Paramètres évalués pour le test de criblage 168

Liste des annexes

Annexe 1: Characterization of antifungal compounds produced by *lactobacilli* in cheese-mimicking matrix: comparison between active and inactive strains (Article soumis)…….215

Annexe 2: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. rhamnosus* 5326……..248

Annexe 3: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. casei* 7006…….....249

Annexe 4: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. spicheri* 6187……..…..250

Annexe 5: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. zymae* 6188……..251

Annexe 6: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. paracasei* 6363…...……...……..252

Annexe 7: Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. casei* 6960…….……...…..253

I – Problématique

Tout au long du processus de transformation et de stockage, les matières premières alimentaires sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes. Leur croissance engendre une modification de ces matières premières. Dans certains cas, le développement d'espèces microbiennes est souhaité. C'est le cas de ferments bactériens qui vont donner au produit final ses qualités organoleptiques. Parmi eux, les genres *Bifidobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* ou encore *Streptococcus* vont, par la fermentation lactique, influer sur le goût, l'acidité, la texture et l'arôme des produits alimentaires. Outre ces propriétés organoleptiques, la croissance de ces organismes permet d'allonger la durée de vie de ces produits **(Magnusson and Schnürer, 2005 ; Zagorec *et al.,* 2013)**. Ceci est notamment dû à la diminution du pH du milieu par production d'acides organiques et/ou par la production de molécules (bactériocines, etc) limitant le développement d'autres micro-organismes. C'est le cas de produits dits « fermentés » tels que les fromages, les yaourts, le vin, les saucissons … Toutefois, des contaminations par des micro-organismes indésirables sont possibles, modifiant les propriétés organoleptiques du produit. Cette flore d'altération est responsable d'une perte estimée entre 5 et 10 % de la production alimentaire dans le monde, notamment à cause de la prolifération de levures et/ou moisissures **(Pitt and Hocking, 2009)**. Ainsi, pour conserver les aliments, il est nécessaire de maîtriser le développement microbien en favorisant certaines flores et en en inhibant d'autres.

Les produits laitiers sont consommés depuis des millénaires à travers le monde sous forme de fromages, de beurres ou encore de yaourts. Les français font partie des plus grands consommateurs de produits laitiers, notamment de fromages avec une consommation estimée à 26,4 kg/habitant/an de fromages en 2017 **(CNIEL, 2019)**. En France, cette filière génère un chiffre d'affaire d'environ 30 milliards d'euros, soit 1/5 du secteur agroalimentaire, ce qui la situe en deuxième position après la filière viande. Ainsi, les enjeux économiques associés à ces produits, et donc également à leur perte, sont importants.

Dans les produits laitiers, les genres contaminants principalement incriminés sont *Candida, Galactomyces, Yarrowia* pour les levures et *Penicillium, Mucor* ou encore *Cladosporium* pour les moisissures (**Garnier *et al.,* 2017a)**. Ces

contaminants peuvent être issus de l'environnement (air, surfaces, matériels, personnel, …) ainsi que des matières premières et des ingrédients.

Pour éviter la prolifération des contaminants alimentaires, plusieurs types de procédés, de nature physique ou chimique, sont couramment utilisés. Pour les premiers, la conservation au froid, la stérilisation, les radiations ionisantes, la dessiccation, ou encore l'emballage sous atmosphère modifiée peuvent être appliqués sur les matrices alimentaires. En ce qui concerne les seconds, une ou plusieurs molécules sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ainsi peuvent être ajoutés des sels (chlorure de sodium, nitrates, nitrites, …), des acides organiques (acide lactique, acide acétique, …), du peroxyde d'hydrogène, des bactériocines (Nisine), des épices, des huiles essentielles, etc **(Zagorec *et al.,* 2013)**. L'utilisation de ces conservateurs est encadrée par la l'Union Européenne (UE) **(Règlement (UE) n°1129/2011)** qui définit la liste des molécules autorisées, leur dose ainsi que leur application alimentaire.

Ces trente dernières années, on constate un rejet de la part des consommateurs de certains composés chimiques tels que les sels et autres additifs alimentaires et une demande de produits plus « naturels ». En effet, la composition des produits alimentaires apparait comme le deuxième facteur d'achat, devant le prix des produits **(Escalon *et al.,* 2008)**. Cette demande se matérialise par l'accroissement de la consommation des produits issus de l'agriculture biologique avec un essor du chiffre d'affaire de cette filière de 0,9 à 8,4 milliards d'euros entre 1999 et 2017 en France **(AgenceBio, 2018)**. De même, des initiatives marketing sont mises en place par les industriels comme le « clean label », un concept visant une déclaration, claire et transparente des ingrédients ajoutés aux produits alimentaires. Le « clean label » est associé à la naturalité des produits et encourage ainsi les industriels à réduire le nombre d'additifs. Cependant, malgré l'encouragement des autorités publiques, aucune législation n'encadre ce label.

La diminution des conservateurs est également soutenue par la commission européenne qui surveille les risques liés à l'ajout des additifs sur la santé des consommateurs. Ainsi en 2018, le sorbate de calcium (E203) a été supprimé de la liste des additifs alimentaires utilisés **(Réglement (UE) 2018/98 de la comission du**

22 janvier 2018) suite à son examen par l'EFSA qui n'a pu mener à bien la réévaluation de la sûreté de ce composé.

En parallèle de cette tendance, la communauté scientifique a montré l'effet bénéfique de la flore naturelle des aliments dans l'effet de barrière des produits. C'est ainsi que le concept de biopréservation a été décrit par Stiles en 1996. La sélection de souches efficaces à partir de cette microflore pour les ajouter par la suite dans de nouvelles matrices alimentaires en est l'enjeu. Ces microorganismes ne doivent pas présenter de risque pour le consommateur et doivent répondre aux critères GRAS « Generally Recognized as Safe » ou QPS « Qualified presumption of safety ». A ce jour, aucun texte ne réglemente clairement l'usage des cultures protectrices à des fins de biopréservation des aliments. Actuellement, les denrées alimentaires sont réglementées par la législation alimentaire générale européenne **(Règlement (CE) n°178/2002)**.

Parmi les souches protectrices naturellement utilisées dans les produits fermentés, les bactéries lactiques et leur production d'acides sont couramment utilisés. Le développement de ces organismes au sein de matrices laitières entraine une diminution de pH essentiellement par la production d'acide lactique. Il s'agit du principal facteur contribuant à l'activité antifongique mais d'autres composés de nature protéique, des molécules volatiles ou encore des acides gras agiraient en synergie avec lui. Cependant, la majorité des molécules actives caractérisées l'ont été dans des milieux de référence et très peu directement en matrices laitières. Si l'activité anti-fongique des lactobacilles au sein de produits laitiers a été établi, la nature et la contribution des diverses molécules produites dans ces milieux restent à élucider.

Ainsi, ce travail de thèse s'articule autour de plusieurs objectifs. **Le premier** était de caractériser, parmi un panel de souches de lactobacilles, celles possédant l'activité antifongique la plus large contre des moisissures mais aussi contre des levures. **Le deuxième** a été de caractériser l'activité de ces souches. Pour cela, les molécules antifongiques connues en milieu de référence (MRS) ont été recherchées et la contribution de composants de ce milieu (source de carbone, acétate de sodium, précurseurs de molécules antifongiques) sur leur production a été étudiée.

Le troisième objectif était l'étude de l'activité de ces mêmes souches en matrices laitières. Ainsi, les molécules antifongiques connues ont été recherchées au sein de ces matrices, en culture seule ou en synergie avec un ferment d'acidification. Enfin, **la quatrième partie** de l'étude a consisté à tenter d'augmenter l'activité antifongique des souches actives. Pour cela, des essais de mutagénèse aléatoires (physico-chimiques ou par insertion de transposon) ont été débutés ainsi que la mise au point d'une méthode de criblage pour la détection des mutants d'intérêts.

II – Généralités

A. Les contaminants fongiques

Les levures et moisissures sont capables de croitre dans une large variété d'aliments, que ce soit dans les matières premières telles que les céréales, les fruits et légumes, la viande ou le lait mais aussi dans les produits transformés. En ce qui concerne les produits laitiers, le lait est traité en amont, par pasteurisation ou stérilisation, afin d'éliminer les contaminants initiaux. De par leur nature, les produits laitiers transformés possèdent une barrière naturelle à divers contaminants. Cette barrière est constituée de la flore microbienne ajoutée à ces produits, qui est utilisée pour abaisser le pH lors de la fermentation et ainsi faire coaguler les protéines mais qui participe aussi à la production de composés essentiels aux propriétés organoleptiques (goût, texture, …). En plus de cette barrière, ces produits sont habituellement stockés au froid, limitant ainsi les risques de prolifération. Cependant, plusieurs espèces fongiques sont capables de survivre puis de croître dans ces produits, du fait de leur capacité à métaboliser certains substrats présents comme les acides organiques, les protéines ou les lipides du lait. Ces organismes sont acidotolérants, xérotolérants et psychrotolérants. Ils peuvent également être résistants à certains conservateurs chimiques comme les acides lactique, acétique, propionique, sorbique ou encore benzoïque **(Piper, 2011; Stratford *et al.*, 2013)**. La présence de ces organismes a plusieurs conséquences sur les produits : croissance visible à la surface, modification de l'odeur et de la flaveur, de la couleur ou encore de la texture. En plus de la détérioration des propriétés organoleptiques, certains genres tels qu'*Aspergillus* et *Penicillium spp.* sont capables de produire des mycotoxines **(Park *et al.,* 2017; Perrone and Susca, 2017)**.

1. Origine

La contamination des produits laitiers peut avoir lieu à toutes les étapes du procédé de fabrication, de la matière première jusqu'aux consommateurs.

a. La matière première

a.1 Le lait

De nombreuses études ont démontré la présence de microorganismes indésirables dans la flore du lait pouvant atteindre des concentrations comprises entre 10^2 et 10^6 UFC/mL, avec une prédominance pour les levures quelle que soit l'origine du lait **(Buehler *et al.,* 2017; Corbo *et al.,* 2001; Fadda *et al.,* 2010, 2004; Gulbe and Valdovska, 2014; Lavoie *et al.,* 2012; Soliman and Aly, 2011; Temelli *et al.,* 2006)**. Cette contamination est susceptible d'intervenir dès la traite des animaux. Plusieurs études rapportent un lien entre la propreté des surfaces des équipements (robot de traite) et la charge fongique de l'air ambiant des exploitations laitières sur la contamination fongique du lait, pouvant varier selon les saisons et la taille de l'exploitation **(Gulbe and Valdovska, 2014; Vacheyrou *et al.,* 2011)**. Malgré une prolifération possible lors du stockage du lait contaminé, celui-ci est généralement traité par la suite à haute température (pasteurisation ou stérilisation) et les levures comme les moisissures ne sont pas thermorésistantes. Cependant, certaines espèces peuvent persister dans le lait pasteurisé notamment à l'état de spores **(Garnier *et al.,* 2017b; Soliman and Aly, 2011; Temelli *et al.*, 2006)**. Les principales contaminations des produits laitiers surviennent donc après les étapes de traitement thermique.

a.2 Autres ingrédients

Dans certains produits, l'ajout d'ingrédients peut être réalisé. C'est le cas lors de l'ajout de fruits, de céréales ou encore de miel dans certains yaourts pouvant apporter des espèces fongiques au produit, et notamment des levures **(Hernández *et al.,* 2018; Penney *et al.*, 2004)**. De plus, ces substrats favorisent la croissance des espèces contaminantes dans les produits industriels **(Penney *et al.,* 2004)**. Il est donc nécessaire de traiter en amont ces composés additionnels, par action de la chaleur par exemple, pour obtenir des niveaux inférieurs à 1 UFC/mL. Cependant, la

présence d'ascospores résistantes à la chaleur sur certains fruits peut rendre ce procédé inefficace **(Tranquillini *et al.,* 2017)**. En effet, dans cette étude, 50% des citrons, 94% des fraises et 100% des échantillons de baies de bleuets se sont révélés positifs à la présence de ces spores résistantes.

a.3 Ingrédients technologiques : cas de la saumure

La saumure, ajoutée à l'étape de salage du processus de préparation de certains fromages à pâte molle, à pâte pressée, cuite ou non, et à pâte persillée, peut aussi être considérée comme une source potentielle de contaminants fongiques. Dans une étude réalisée dans une usine produisant du Gouda et du Cheddar, un taux de 10^4 UFC/mL de levures a été retrouvé dans les bacs de saumure **(Viljoen and Greyling, 1995)**. Dans une autre étude plus récente, l'analyse de la flore microbienne de différentes saumures issues de quatre laiteries danoises produisant du fromage Danbo a montré la présence de levures jusqu'à $5{,}0.10^3$ UFC/mL **(Haastrup *et al.,* 2018)**.

b. L'environnement de transformation

Quelques études se sont penchées sur l'environnement de fabrication des produits laitiers. La contamination par les moisissures est principalement corrélée aux spores présentes dans l'air ambiant dans les industries laitières **(Beletsiotis *et al.,* 2012; Garnier *et al.,* 2017b; Kure *et al.,* 2008, 2004; Zerfiridis *et al.,* 2010).** Par exemple, dans une laiterie industrielle danoise, des concentrations de moisissures cultivables de 6.10^3 UFC/m^3 ont été mesurées dans une zone de conditionnement de fromages **(Dahl *et al.,* 1994)**. Chaumont et collaborateurs ont mesuré en 2001 des concentrations supérieures à $2{,}5.10^4$ UFC/m^3 dans des caves d'affinage de Comté, à 2.10^3 UFC/m^3 dans des caves d'emmentals et jusqu'à 4.10^4 UFC/m^3 dans les caves où était conservé du Mont d'Or **(Chaumont *et al.,* 2001)**. Des concentrations comprises entre $6{,}1.10^2$ et $9{,}0.10^3$ UFC/m^3 ont été mesurées dans une usine de fabrication de fromage située dans une laiterie industrielle brésilienne **(Salustiano *et al.,* 2003)**. Kure et collaborateurs ont dénombré les populations fongiques cultivables dans l'air de six usines produisant des fromages à pâte pressée non cuite en 2008. Les valeurs obtenues sont comprises entre 1,0 et $2{,}7.10^3$ UFC/m^3 **(Kure *et al.,***

2008). Des mesures dans trois fosses de maturation en Italie ont révélé des concentrations comprises entre $5{,}3.10^2$ et $7{,}5.10^2$ UFC/m^3 **(De Santi *et al.,* 2010)**. Dans une étude réalisée dans une usine laitière grecque, les numérations fongiques sont similaires avec des valeurs variant de $7{,}0.10^2$ UFC/m^3 à $2{,}7.10^3$ UFC/m^3 **(Beletsiotis *et al.,* 2012)**. Des taux nettement plus élevées, allant de 10^4 à 10^8 UFC/m^3, ont été relevées plus récemment dans une usine française de fromage à croûte naturelle **(Simon and Duquenne, 2014)**.

La contamination par les levures est, quant à elle, plus associée aux surfaces de travail, aux matériels et aux personnels travaillant en usine **(Welthagen and Viljoen, 1998)**. Le nettoyage complet, garantissant l'élimination de tous les résidus issus des lignes de production et des équipements, est essentiel pour éliminer ce type de contaminants **(Kure *et al.,* 2004; Pitt and Hocking, 2009)**.

c. Chez le consommateur

Malgré une contamination possible chez le consommateur, il n'existe que très peu d'études traitant de ce sujet. Dans une étude italienne récente, 586 échantillons de surface ont été prélevés dans 293 réfrigérateurs domestiques. 15% des réfrigérateurs analysés ont révélé la présence de moisissures et 5% ont révélé la présence de levures à des concentrations comprise entre 1.10^1 et 3.10^3UFC/cm^2 **(Catellani *et al.,* 2014)**. Dans une autre étude nigérienne, 50 réfrigérateurs domestiques ont été analysés au hasard. Parmi eux, 32% ont révélé une contamination fongique **(Otu-bassey *et al.,* 2017)**.

Outre les surfaces de réfrigérateur, la contamination croisée d'un produit à un autre peut également être responsable de la contamination fongique. Par exemple, certains fromages sont affinés avec moisissures (*Penicillium*). De même, les fruits et légumes sont des sources potentielles de contamination par les levures et les moisissures **(Filtenborg *et al.,* 1996)**. Enfin, l'air intérieur du domicile du consommateur est également une source potentielle de moisissures **(Garnier *et al.,* 2017a)**.

2. La contamination par les levures

Comme vu précédemment, les produits laitiers sont susceptibles d'être contaminés par des levures. Leur croissance au sein de ces produits peut entrainer une détérioration comme une croissance en surface, des altérations de l'odeur, des arômes ou des textures. Ces conséquences sont dues, en plus de la croissance microbienne, à la production de nombreuses molécules tels que : l'éthanol, le CO_2, certains composés organiques volatiles (alcools primaires et secondaires, aldéhydes, esters) et certaines enzymes lipolytiques et protéolytiques. Plusieurs genres ont été isolés des contaminations des produits laitiers : *Candida*, *Rhodoturula*, *Yarrowia*, *Galactomyces* ou encore *Saccharomyces* **(Garnier *et al.,* 2017a)**.

a. Le genre *Candida*

Le genre *Candida* appartient au phylum des *Ascomycota*. Il regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de pseudomycélium, voire de mycélium, et possédant la capacité de fermenter les sucres. Actuellement, environ 200 espèces sont référencées. Les levures *Candida* font partie du genre le plus isolé dans tous les produits laitiers, principalement des produits non affinés (lait de différentes origines, yaourt) ainsi que des fromages à pâte dure ou demi-dure **(Buehler *et al.,* 2017; Garnier *et al.,* 2017a)**. Ce genre apparaît également comme le contaminant le plus diversifié avec plus d'une vingtaine d'espèces isolées telles que : *Candida parapsilosis*, *Candida intermedia*, *Candida lusitaniae*, *Candida inconspicua*, etc. Certaines font partie de la flore commensale des animaux comme *C. parapsilosis* ou peuvent être retrouvées dans le tube digestif comme *C. lusitaniae*. Quelques espèces sont reconnues comme responsables d'infections opportunistes chez l'Homme (candidose) comme *C. parapsilosis* ou *C. lusitaniae* **(Arendrup *et al.,* 2014)**.

b. Le genre *Rhodoturula*

Le genre *Rhodoturula* regroupe environ 40 espèces de levures pigmentées appartenant au phylum des *Basidiomycota*. Trois espèces ont été isolées de différents produits laitiers : *Rhodoturula mucilaginosa*, *Rhodoturula glutinis* et *Rhodoturula diffluens*. Ces espèces sont retrouvées dans les fromages, le beurre, les

yaourts **(Garnier *et al.,* 2017a)**. La plupart des espèces de *Rhodotorula* ont une couleur rose à corail (voire orange) en raison de la présence de pigments caroténoïdes. Ainsi, à la différence du genre *Candida*, le développement en surface des *Rhodoturula* est visible dans les produits laitiers (Figure 1). Quelques espèces de *Rhodoturula* sont reconnues comme responsables d'infection dont *Rhodoturula mucilaginosa* et *Rhodoturula glutinis* **(Arendrup *et al.,* 2014)**. Ce genre peut être présent dans l'air et les surfaces des usines laitières **(Viljoen and Greyling, 1995)**.



Figure 1 : Contamination d'un yaourt par *R. mucilaginosa*

c. *Yarrowia lipolytica*

Tout comme les levures du genre *Candida*, les levures du genre *Yarrowia* appartiennent au phylum des *Ascomycota*. Seule une espèce a été isolée dans les produits laitiers : *Yarrowia lipolytica*. Elle est retrouvée dans différents types de produits laitiers tels que les fromages, les yaourts ou encore les beurres **(Garnier *et al.,* 2017a)**. Cette levure est responsable de la production d'amines biogènes dans le fromage italien traditionnel comme : la putrescine, le 2-phényléthylamine, la tyramine et la cadaverine. Elle est également responsable de réactions de brunissement, indésirables dans le fromage, lors du catabolisme de la tyrosine **(Carreira *et al.,* 2001)**. La contamination des produits laitiers peut avoir lieu lors du salage des fromages (par la saumure) ou par contact avec des surfaces contaminées **(Viljoen and Greyling, 1995)**.

d. Autres genres

Le genre *Geotrichum,* dont les deux espèces *G. capitatum* et *G. klebahnii*, est retrouvé principalement dans les fromages et le lait **(Garnier *et al.,* 2017a)**. Dans l'industrie fromagère, *G. capitatum* est responsable d'accidents industriels tels que l'apparition de cœurs jaunes dans les fromages à pâte persillée, des défauts de croûtage dans les fromages à pâtes pressées et cuites ou encore un aspect huileux sur les fromages à pâtes molles **(Branger *et al.,* 2007)**.

Au sein du genre *Saccharomyces*, l'espèce *S. cerevisiae* est principalement isolée dans le lait, les fromages et les yaourts. Cette levure est capable de croitre à faible température (5 °C) et de fermenter le galactose.

3. La contamination par les moisissures

La contamination par les moisissures entraîne une détérioration des produits laitiers. La croissance de ces organismes est visible à la surface des produits (principalement sous forme de mycélium). Certains genres sont également responsables de la détérioration des produits par la production de composés altérant leur goût (cétones, alcools, …). Dans certains cas, il peut y avoir production de mycotoxines. Comme décrit précédemment, les spores de ces organismes sont principalement véhiculées dans l'air des usines de transformations.

a. Le genre *Penicillium*

Parmi les nombreuses études concernant la diversité des contaminants fongiques dans les produits laitiers, le genre *Penicillium* est le plus fréquemment isolé **(Buehler *et al.,* 2017; Garnier *et al.,* 2017a)**. Ce genre est également souvent retrouvé lors de l'identification de spores dans l'air **(Beletsiotis *et al.,* 2012; Chaumont *et al.,* 2001; De Santi *et al.,* 2010; Simon and Duquenne, 2014)**.Il appartient au phylum des *Ascomycota,* à la classe des *Eurotiomycetes* et regroupe actuellement environ 350 espèces dont une quarantaine ont été isolées de contaminations de produits laitiers **(Garnier *et al.,* 2017a; Perrone and Susca, 2017)**. Parmi les *Penicillium* isolés des produits laitiers, on retrouve cinq sections : les *Fasciculata* (11 espèces), les *Chrysogena* (trois espèces), les *Biverticillium* (quatre espèces), les *Brevicompacta* (trois espèces) et les *Aspergilloides* (deux

espèces) **(Garnier *et al.*, 2017a).** La croissance de cette moisissures est visible en surface des produits laitiers (Figure 2). Certaines espèces comme *P. roqueforti* ou *P. chrysogenum* forment des mycéliums de couleurs bleu-gris-vert tandis que *P. camembertii* est caractérisé par un mycélium blanc. Si le développement de ces espèces est nécessaire pour l'affinage de certains fromages à croûte fleurie comme le camembert (*P. camembertii*) ou à pâte persillées tels que le roquefort (*P. roqueforti*), il est à proscrire dans d'autres cas et notamment dans les pâtes pressées cuites.



Figure 2 : Contamination d'un yaourt par *P. chrysogenum*

Les moisissures du genre *Penicillium* ont été isolées dans tous types de fromages, dans le beurre ou encore dans des yaourts. Elles sont strictement aérobies, peu exigeantes sur le plan nutritionnel et donc capables de se développer et de résister dans un large éventail d'environnements. Ce sont des moisissures à croissance rapide, produisant un grand nombre de spores facilement disséminées par voie aérienne. La plupart des espèces d'origine alimentaire de *Penicillium* sont psychrotolérantes. Même si ces espèces sont principalement mésophiles (température optimale de 25 °C), ces moisissures peuvent se développer entre 5 et 37 °C **(Perrone and Susca, 2017)**.

Certaines espèces sont productrices de mycotoxines dans les produits laitiers tels que l'Ochratoxine A (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum* ou encore *P. crustosum*), l'acide cyclopiazonique (*P. commume*, *P. camamberti*, *P. palitans*, *P. dipodomyicola*, *P. griseofulvum*) ou encore la

Roquefortine C (*P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. expansum*) **(Perrone and Susca, 2017)**. Certains *Penicillium* tels que *P. glabrum*, *P. expansum* et *P. chrysogenum* peuvent être responsables d'odeurs indésirables par la production de 2-méthylisoborneol et géosmine.

b. Le genre *Aspergillus*

Comme le genre *Penicillium* dont ils sont phylogénétiquement très proches, les *Aspergillus* appartiennent au phylum des *Ascomycota* et à la classe des *Eurotiomycetes*. Actuellement, environ 340 espèces sont recensées dans ce genre **(Park *et al.,* 2017)**. Parmi elles, dix ont été isolées dans les produits laitiers dont *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*. **(Garnier *et al.,* 2017a)**. Comme chez *Penicillium*, la croissance est visible à la surface des produits laitiers. Les *Aspergillus* ont été isolés à partir de contaminations de lait (vache, chèvre, brebis), de yaourt et de fromage. La teinte des mycéliums d'*Aspergillus* peut différer selon les espèces : *A. candidatus* est blanc, *A. ochraceus* est ocre, *A. niger* est noir et *A. flavus* est plutôt dans les tons verts. Ce genre peut produire dans les produits laitiers une mycotoxine, l'aflatoxine M1 (AFM1) **(Bellio *et al.,* 2016)**. Uniquement pour cette mycotoxine, il existe une réglementation fixée par l'Union Européenne du taux maximum retrouvé dans un produit alimentaire à 0.05 ppb **(Régulation (EC) N°401/2006 du 23 février, 2006)**.

c. Autres genres

Parmi les autres genres retrouvés dans les produits laitiers, dix espèces du genre *Cladosporium* ont été isolées principalement dans les fromages à pâte dure et semi-dure mais également dans le beurre et le lait **(Garnier *et al.,* 2017a)**. *Cladosporium spp*. se développe lentement mais est résistant dans les produits laitiers puisque ces espèces sont psychrotolérantes et xérotolérantes Ces contaminants peuvent être retrouvés sur les matériels et ustensiles utilisés en industries agro-alimentaires mais aussi largement dans l'air **(Garnier *et al.,* 2017a; Ohta *et al.,* 2006)**. Ainsi, ils peuvent être à l'origine d'accidents industriels, notamment en étant à l'origine des tâches jaunes à brunes dans les sillons laissées par les claies **(Branger *et al.,* 2007)**.

Les moisissures du genre *Mucor* peuvent être retrouvées dans les fromages à pâtes molles et les yaourts. Elles peuvent entraîner des défauts d'aspect des produits (par sa croissance en surface sous forme d'un mycélium gris et de sporanges noirs) et d'affinage (par le retard de croissance de certains *Penicillium* désirables) **(Branger *et al.,* 2007).** A ce jour, quatre espèces ont été décrites dans les matrices laitières : *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. plumbeus* et *M. racemosus* **(Garnier *et al.,* 2017a)**.

B. La biopréservation

Au cours des dernières décennies, une prise de conscience des consommateurs a conduit à chercher de nouvelles alternatives aux additifs chimiques incorporés dans les produits alimentaires comme conservateurs: nitrates, acide sorbique, acide propionique, acide benzoïque ou encore nisine en fonction de leur application dans les produits laitiers **(FAO, 2019)**. En parallèle, la communauté scientifique a développé le concept de technologie de barrière des aliments **(Leistner, 2000)**. Ce concept vise à appliquer un ensemble de procédés qui vont chacun contribuer à l'inhibition du développement de flores indésirables. Parmi les différentes composantes mises en lumière par la communauté scientifique, on peut citer notamment l'effet barrière créé par la flore naturelle des produits. Ainsi, le terme anglais « biopreservation » fut défini pour la première fois en 1996 par Stiles : « Biopreservation refers to extended storage life and enhanced safety of foods using the natural microflora and (or) their antibacterial products » c'est-à-dire « la biopréservation fait réfèrence à une prolongation de la durée de vie et une meilleure qualité sanitaire des aliments par l'utilisation de la microflore natruelles et/ou de ses métabolites antibactériens ».Dans les produits laitiers, la biopréservation par les LAB est actuellement la principale alternative aux conservateurs **(Leyva Salas *et al.,* 2017)**.

1. Les bactéries lactiques

Le groupe des LAB a été décrit pour la première fois au début du XXème siècle **(Orla-Jensen, 1919)** désignant les bactéries capables d'acidifier le lait par la production d'acide lactique. Les critères de cette classification se référaient à la morphologie cellulaire, la voie de fermentation du glucose, les températures de

croissance et la métabolisation des différents sucres. Les LAB représentent un groupe hétérogène d'organismes appartenant au phylum *Firmicutes,* de la classe *Bacilli* et de l'ordre des *Lactobacillales*. Ce sont des bactéries à gram positif, non sporulantes, non mobiles, aérotolérantes, en forme de bâtonnets ou de coques et avec un faible pourcentage des bases guanine et cytosine dans leur génome (Holzapfel and Wood, 1995). Comme leur nom l'indique, ces organismes produisent de l'acide lactique comme produit final principal lors de la fermentation des glucides par les voies homofermentaire ou hétérofermentaire (Figure 3).

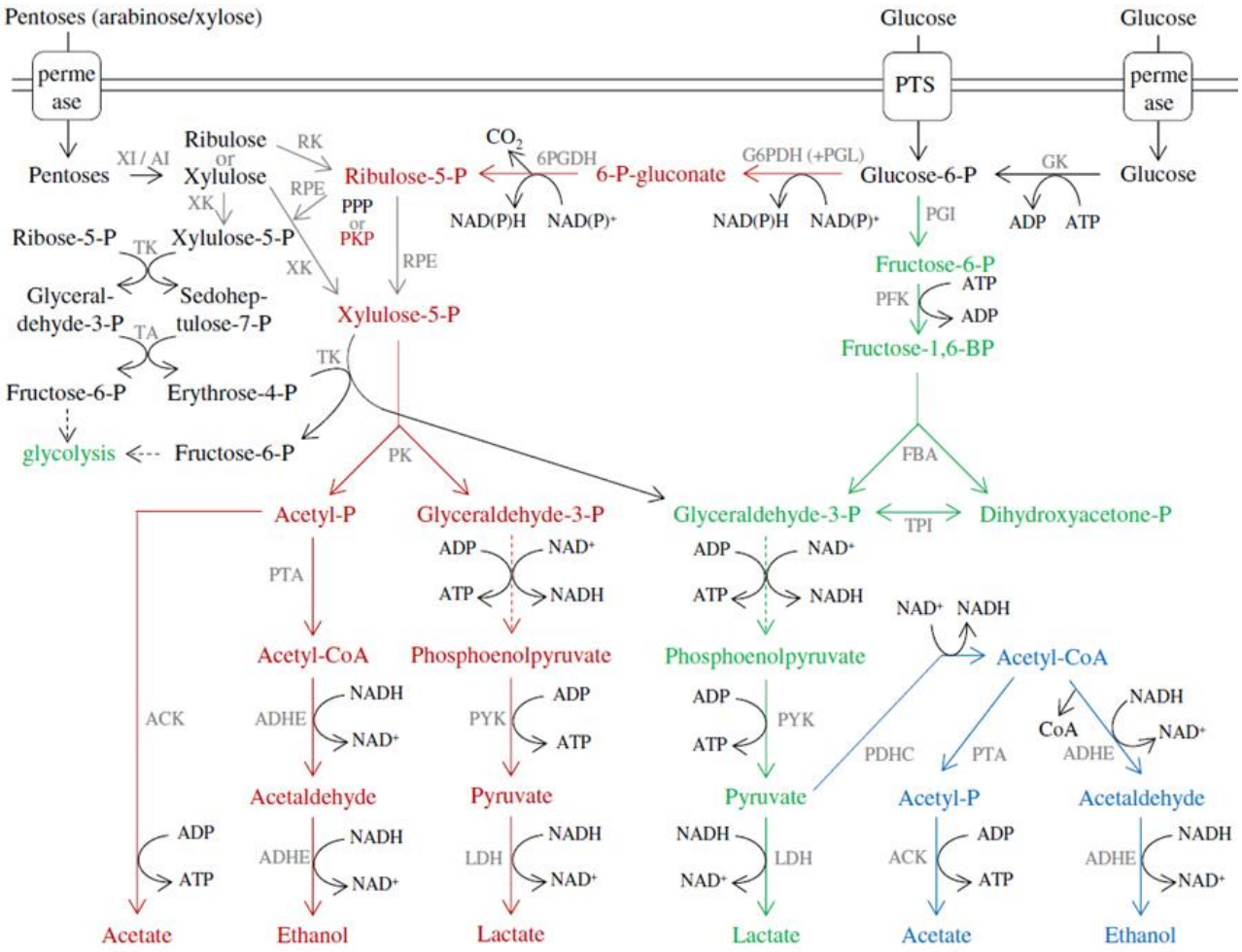


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la fermentation lactique des LAB par différentes voies (Issu de Bosma *et al.,* 2017).
En vert : la fermentation homolactique des hexoses par la voie d'Emden-Meyerhof avec le lactate comme produit final. **En rouge** : la fermentation hétérolactique avec le lactate, l'éthanol et l'acétate comme produits finaux. **En noir** : la voie des pentoses phosphate rejoignant par la suite la voie d'Emden-Meyerhof (Glycolyse). **En bleu** : Fermentation par la voie des acides mixtes. Toutes ces voies ne sont pas forcément présentes chez une souche de LAB.

Historiquement, la taxonomie énumérait quatre genres impliqués dans les fermentations alimentaires : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Orla-Jensen, 1919). Cependant, les reclassements ont modifié ce groupe initial et certains genres y ont été ajoutés : *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, et Weissella* (Figure 4) **(Lahtinen *et al.*, 2012)**.

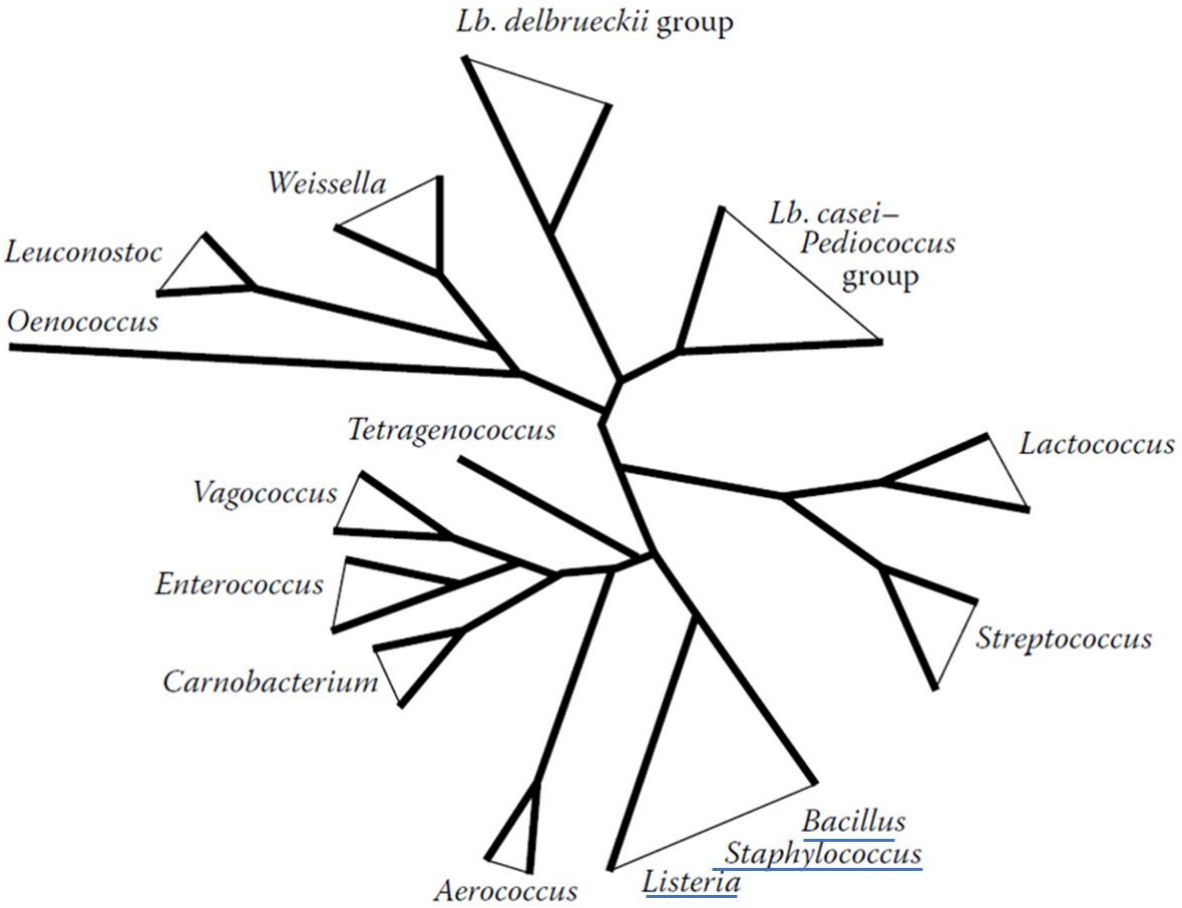


Figure 4 : Arbre phylogénétique non raciné des différents genres de LAB, comprenant également d'autres *Firmicutes* aérobies et anaérobies (surlignage bleu) (Lahtinen *et al.,* 2012)

Ces bactéries sont considérées comme non pathogènes et la majorité sont classées parmi les microorganismes « GRAS » (« Generally Recognized As Safe ») par la « Food and Drug Administration » (FDA) aux Etats-Unis **(FDA, 2019)** et dans la législation « QPS » (« Qualified presumption of safety ») par la « l'European Food Safety Authority » en Europe **(Koutsoumanis *et al.*, 2019)**.

a. Le genre *Lactococcus*

Les bactéries du genre *Lactococcus* appartiennent à la famille des *Streptococcaceae* avec les genres *Streptococcus* et *Lactovum*. Quatorze espèces sont actuellement décrites dont *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus fujiensis* **(Goodman *et al.*, 2017; Mcauliffe, 2018)**. L'espèce *L. lactis* est elle-même divisée en quatre sous-espèces : *L. lactis* subsp*. lactis*, *L. lactis* subsp*. cremoris*, *L. lactis* subsp*. hordniae* et *L. lactis* subsp*. tructae.* Les lactocoques ont une taille de 0,5 à 1,5 µm, et forment des chaînes courtes (Figure 5). Ils sont mésophiles et fermentent les hexoses par la voie homofermentaire.

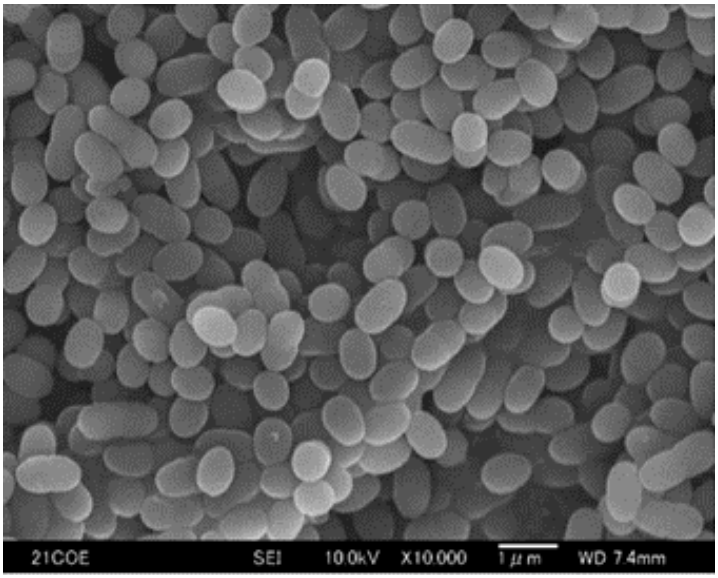


Figure 5 : *Lactococcus lactis* JCM 5805 observé en microscopie électronique à balayage **(Nomura *et al.*, 2009)**

Les sous-espèces *L. lactis* subsp*. cremoris* et *L. lactis* subsp*. lactis* sont utilisées en agro-alimentaire dans la fabrication de produits laitiers fermentés et notamment les fromages ou les laits fermentés (Table 1) **(Whitman, 2009)**. Les *L. lactis subsp. lactis* sont tolérants au sel (croissance à 4% de NaCl) et ont la capacité d'hydrolyser l'arginine. Certains variants de *L. lactis subsp*. *lactis* produisent du diacétyle et sont donc souvent appelés biovar. *diacetylactis* **(Lahtinen *et al.*, 2012)**. Ces lactocoques sont souvent associés dans les produits laitiers à *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, à la fois pour la production de laits fermentés et mais aussi de fromages.

Les lactocoques développent les qualités organoleptiques des produits lors de l'affinage, notamment par la formation de diacétyle à partir du citrate du lait (0,1%), présent en solution et dans les micelles de caséine sous forme de complexe caséine-citrate-calcium-phosphate (Figure 6) **(Visser *et al.,* 1979; Whitman, 2009)**. Outre la production de diacétyle, les lactocoques participent à la protéolyse pendant l'affinage du fromage grâce à une protéase, associée à la paroi cellulaire, spécifique de la caséine β, ainsi qu'à un complexe de peptidases comprenant une aminopeptidase, une X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase et une dipeptidase **(Stiles and Holzapfel, 1997; Whitman, 2009)**. De plus, ils permettent l'acidification du milieu par la fermentation du lactose en acide lactique. Cette acidification permet le « caillage » du lait (avec ou sans ajout de pressure) et la formation de la matrice fromagère ainsi que sa conservation en inhibant la prolifération de flores indésirables.

Tableau 1 : Utilisation de *Lactococcus* en tant que ferment (à partir du Whitman, 2009).

Produits laitiers	**Ferments utilisés**
Fromages type Cheddar, Camembert et Tilsit	*L. lactis* subsp. *cremoris* 95–98%; *L. lactis* subsp. *lactis* 2–5%
Fromage frais, quarg, lait fermenté, Fromage de type Edam	*L. lactis* subsp. *cremoris* 95% et *L.mesenteroides* subsp. *cremoris* 5% ou *L. lactis* subsp. *cremoris* 85–90%, *L. lactis* subsp. *lactis* 3%, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* 5%
Beurre, lait fermenté, fromages de type Gouda	*L. lactis* subsp. *cremoris* 70–75%, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 15–20%, et *L. mesneteroides* subsp. *cremoris* 2–5%
Lait fermenté scandinave taette	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
Lait fermenté Viili	*Oidium lactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris*
Lait fermenté Kefir	*Candida kefir*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofacians*, *L. lactis* subsp. *lactis*

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, qui agissent généralement contre les cellules cibles en formant des pores dans la membrane ou en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Les souches bactériennes productrices sont utilisées comme bioconservateurs dans les aliments depuis des décennies. Ainsi, en plus de leur activité d'acidification du milieu, plusieurs souches de *L. lactis subsp. lactis* produisent la nisine, une bactériocine de classe I de 34 acides aminés **(Holzapfel and Wood, 1995)**. Cette bactériocine inhibe fortement la croissance d'une large gamme de bactéries à Gram positif telles que les pathogènes alimentaires *Listeria monocytogenes* ou *Clostridium botulinum*. Depuis son agrément, la nisine est utilisée comme additif alimentaire (E234). Cet ajout est notamment utilisé dans des produits laitiers tels que les fromages **(Holzapfel and Wood, 1995)**.

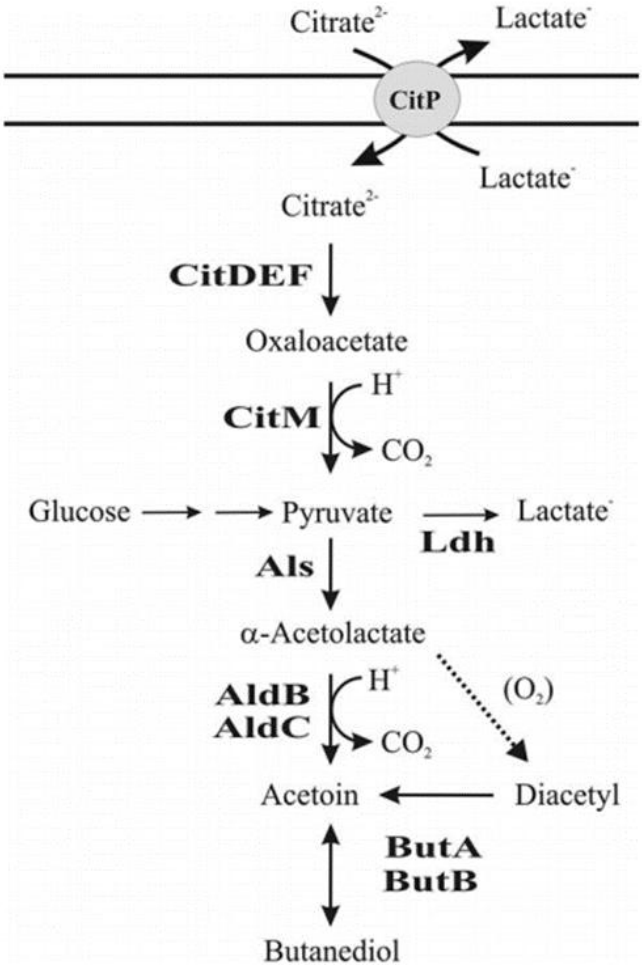


Figure 6 : Voie métabolique du citrate et production du diacétyle à pH acide (5.5) par *Lactococcus* bv. diacetylactis CRL264 (proposé par **García-Quintáns *et al.*, 2008**)

b. Le genre *Lactobacillus*

b.1 Généralités

Les bactéries du genre *Lactobacillus* appartiennent à la famille des *Lactobacillaceae* avec les genres *Pediococcus* et *Paralactobacillus*. Dans ce genre, on dénombre environ 200 espèces dont 36 sont reconnues dans la législation QPS et 12 dans la législation GRAS (Figure 7 et 8) **(FDA, 2019.; Ricci *et al.*, 2017)**.

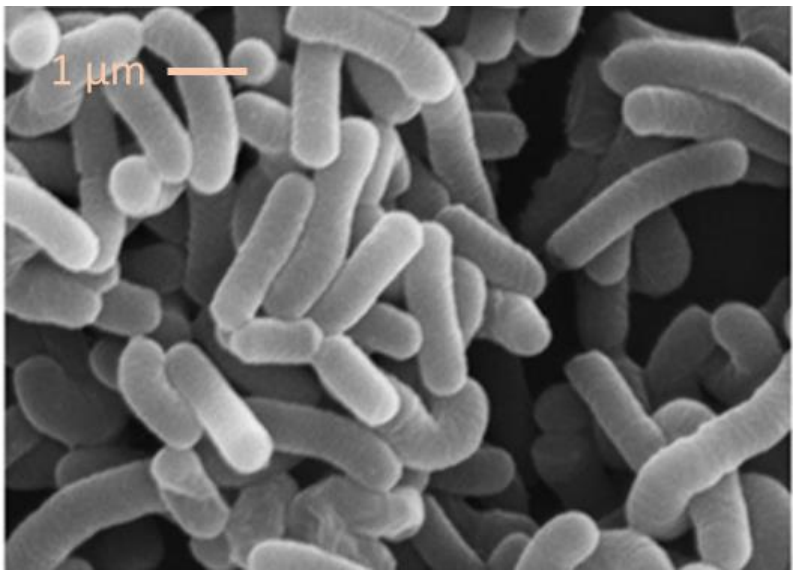


Figure 7 : *Lactobacillus casei* Shirota observée par microscopie électronique à balayage (x10 000) **(Liew *et al.*, 2018)**.

Ces espèces sont réparties en trois groupes métaboliques distincts : les homofermentaires obligatoires (**A**), les hétérofermentaires facultatives (**B**) et les hétérofermentaires obligatoires (**C**) (Bergey's manual 2009). Les lactobacilles du **groupe A** fermentent presque exclusivement les hexoses en acide lactique (environ 85%) par la voie d'Embden Meyerhof-Parnas (EMP) (Figure 3). Ces *Lactobacillus* possèdent la fructose-1,6-bisphosphate-aldolase mais pas de phosphocétolase. Ainsi, ils ne peuvent fermenter ni le gluconate ni les pentoses. Les bactéries du **groupe B** fermentent les hexoses, presque exclusivement en acide lactique par la voie EMP, mais aussi les pentoses (Figure 3). Le **groupe C** fermente les hexoses et les pentoses par la voie des pentoses phosphates (ou voie du phosphogluconate) donnant ainsi du lactate, de l'éthanol, de l'acide acétique et du CO_2 en quantités équimolaires (Figure 3). Les pentoses peuvent être également fermentés par cette voie.

Les lactobacilles font partie du microbiote naturel des animaux. Ils sont retrouvés dans les tractus gastro-intestinal et urogénital, dans la cavité buccale et sur la peau, comme les espèces *L. rhamnosus*, *L. gasseri* et *L. casei* **(Lahtinen *et al.,* 2012)*.*** Ils sont aussi naturellement présents sur les végétaux et dans les sols. Ces bactéries peuvent se développer dans une gamme de température relativement large allant de 2 à 53°C, avec un optimum de croissance compris entre 30 et 40°C. Les *Lactobacillus* croissent à un pH optimal de 5,5-6,2 mais peuvent aussi se développer à des valeurs de pH inférieures à 5. Ils ont des besoins complexes en nutriments, caractéristiques de chaque espèce ou souche.

Les lactobacilles sont présents dans l'alimentation humaine depuis des millénaires lorsque l'absence de moyens de conservation entraînait la fermentation naturelle d'une grande partie de la nourriture stockée **(Lahtinen *et al.,* 2012)**. De nos jours, les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire, notamment dans l'industrie laitière. L'espèce *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* est utilisée lors de la fabrication de yaourts, en association avec *Streptococcus thermophilus*. D'autres espèces sont utilisées dans l'affinage de fromages (*L. casei, L. plantarum, L. brevis, L. buchneri*,…). Les laits fermentés peuvent faire intervenir des lactobacilles et notamment l'espèce *Lactobacillus kefiranofaciens* comme dans certains kéfirs. Certains lactobacilles sont également commercialisés comme probiotiques (sous forme de compléments alimentaires ou dans des aliments fermentés), parmi lesquels des souches appartenant aux espèces *L. acidophilus*, *L. casei, L. rhamnosus*, *L. plantarum* ou encore *L. reuteri* **(Lahtinen *et al.,* 2012)**.

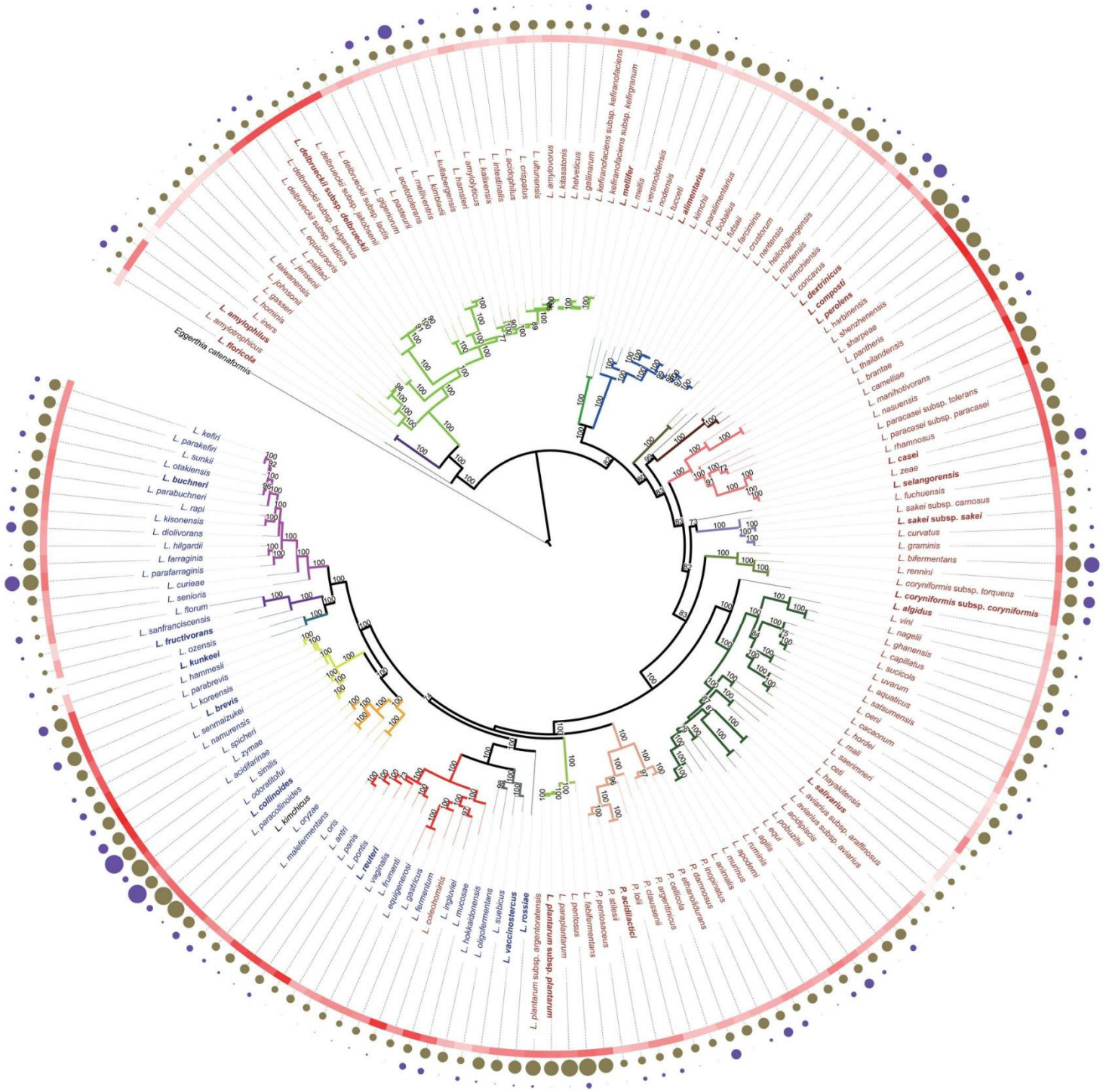


Figure 8 : Arbre phylogénétique de 174 espèces de *Lactobacillus* et de *Pediococcus* basé sur les séquences protéiques de gênes à copie unique du pangénome **(Zheng *et al.*, 2015)**. Les espèces **homofermentaires** sont **en rouge** et les espèces **hétérofermentaires** sont **en bleu**. Le **dégradé rouge** représente le **pourcentage en GC** du génome : les teneurs les plus élevées sont plus foncées et inversement. Le diamètre des **cercles marron** est proportionnel à la **taille du génome** des souches analysées. Le diamètre des cercles **violets** est proportionnel au **nombre d'espaceurs CRISPR** (répétitions de séquence d'ADN courtes, palindromiques et régulièrement espacées).

b.2 Activité antifongique

Plusieurs espèces de *Lactobacillus* possèdent une activité antifongique. Celle-ci a été observée dans divers milieux comme le MRS (de De Man, Rogosa et Sharpe) (milieu de référence pour la culture des *Lactobacillus*) ou des matrices laitières de type lait fermenté, yaourt ou encore fromage.

b.2.1 Activité en milieu de laboratoire

En milieu MRS, les activités contre moisissures et/ou levures ont été mises en évidence sur milieu gélosé ou dans le surnageant de culture de nombreuses espèces de lactobacilles, démontrant ainsi le potentiel antifongique de ce genre bactérien (Tableau 2).

b.2.2 Activité en matrice laitière

En matrice laitière, plusieurs études se sont concentrées sur les activités antifongiques de lactobacilles, notamment par leur ajout dans les yaourts avant la fermentation du produit. En 2012, une étude irlandaise a porté sur l'ajout de la souche *L. plantarum* 16 à une concentration de 8 $\log_{10}$UFC/mL **(Crowley *et al.,* 2012)**. Ceci a entrainé un effet fongistatique contre une souche de levure contaminante, *R. mucilaginosa*, après un stockage de 31 jours à 4°C. En 2013, une étude chinoise a rapporté que l'ajout de la souche *L. casei* AST18, à des concentrations comprises entre 7,6 et 8,4 $\log_{10}$UFC/mL, inhibe la croissance d'une souche de *Penicillium* sp. durant un stockage de 22 jours à 4°C **(Li *et al.,* 2013)**. En 2014, une étude a montré que l'ajout de la souche *L. harbinensis* K.V9.3.3Np, à une concentration de 6,4 $\log_{10}$UFC/mL, inhibe totalement la croissance de la levure contaminante *Y. lipolytica* pendant 5 semaines de stockage à 10°C **(Delavenne *et al.,* 2015)**. Dans ce même modèle, une étude tchèque reporte que l'ajout de la souche *L. rhamnosus* $BIO_{III}28$, à un inoculum de départ de 7 $\log_{10}$CFU/mL, inhibe totalement la croissance d'une souche de levure *R. mucilaginosa* et fortement une souche de moisissure *P. breviscompactum* après 5 semaines à 10°C **(Lačanin *et al.,* 2017)**.

Tableau 2 : Différentes espèces de lactobacilles possédant une activité antifongique sur milieu gélosé ou dans leur surnageant de culture en milieu MRS

Espèces	Cibles	Références
L. acidophilus	*Penicillium sp., P. digitatum, F. graminearum, G. citri-aurantii*	(Gerez *et al.,* 2013)
L. amylovorus	*A. niger, A. fumigatus, F. culmorum P. expansum, P. roqueforti*	(Ryan *et al.,* 2011)
L. brevis	*A. niger, Fusarium spp., K. marxianus, Meyerozyma guillermondii, P. camemberti, P. roqueforti, Rhizopus oryzae, S. cerevisiae, Torulopsis candida*	(Falguni *et al.,* 2010; Mauch *et al.,* 2010)
L. casei	*Penicillium sp., P. digitatum, F. graminearum, G. citri-aurantii*	(Gerez *et al.,* 2013)
L. coryniformis	*A.fumigatus, A. nidulans, D. hansenii, Fusarium poae, F. graminearum, F. culmorum, F. sporotrichoides, K. marxianus, Mucor hiemalis, P. roqueforti, S.cerevisiae, Talaromyces flavus*	(Magnusson and Schnürer, 2001)
L. fermentum	*Penicillium sp., P. digitatum, F. graminearum, G. citri-aurantii*	(Gerez *et al.,* 2013)
L. paracasei	*C.albicans, Candida blankii, Candida pseudointermedia,*	(Atanassova *et al.,* 2003)
L. pentosus	*A. candidus, C. albicans, P. nalgiovense*	(Coloretti *et al.,* 2007; Okkers *et al.,* 1999)
L. plantarum	*A. candidus, A. flavus, A. fumigatus, A. parasiticus A. niger, A. ochraceus, A. tubingensis, F. graminearum, Fusarium sporotrichioides, Eurotium herbariorum, Eurotium rubrum, G. candidum, G. citri-aurantii, K. marxianus, M. racemosus, Penicillium sp., P. chrysogenum, P. camemberti, P. chrysogenum, P. crustosum, P. digitatum, P. expasum, P. nalgiovense, P. roqueforti, P. verrucosum , Moniliella spp., Mucor racemosus, R. stolonifer, Wallemia sebi*	(Coloretti *et al.,* 2007; Gerez *et al.,* 2013; Gupta and Srivastava, 2014; Luz *et al.,* 2017; Muhialdin *et al.,* 2016; Ndagano *et al.,* 2011; Ström *et al.,* 2002)
L. reteuri	*Penicillium sp., P. digitatum, F. graminearum, G. citri-aurantii, Trichophyton tonsurans*	(Gerez *et al.,* 2013; Guo *et al.,* 2011)
L. rhamnosus	*P.aurantioviolaceum, M. plumbeus*	(Bazukyan et al., 2018)

La combinaison de certaines souches de biopréservation, notamment des associations de souches de lactobacilles, peut permettre d'augmenter l'activité antifongique. La combinaison des souches *L. plantarum* L244 avec *L. harbinensis* L172 (A1) ou avec *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 (A3), dans un modèle de fromage à des concentrations de 7,3 log_{10}UFC/mL, a permis d'augmenter l'activité, notamment contre la croissance de souches de *Penicillium bialiwiezense*, *Penicillium commune* ou encore *Meyerozyla guillermondii* **(Salas *et al.,* 2018)**. L'association des souches *L. rhamnosus* CH126 et *L. paracasei* CH127 est également décrite, dans un lait fermenté, contre la prolifération de la levure *Debaromyces hansenii* **(Mcnair *et al.,* 2018)**.

La biopréseravtion des yaourts par les lactobacilles en association avec *Propionibacterium jensenii* a également été étudiée contre la contamination par les levures. En 2003, une étude suisse a montré que l'association de 7,7 log_{10}UFC/mL de *Propionibacterium jensenii* et 8.2 log_{10}UFC/mL de *L. paracasei* subsp. *paracasei* SM20 inhibe la croissance d'un mélange de trois souches de *Candida* (*C. pulcherrima*, *C. magnoliae*, *C. parapsilosis*) et d'une souche de *Zygosaccharomyces bailii* pendant 4 semaines à 6°C **(Schwenninger and Meile, 2004)**.

Plusieurs ferments de biopréservation contenant des souches de lactobacilles ou des combinaisons impliquant des souches lactobacilles sont disponibles sur le marché pour les industriels laitiers (Tableau 3).

Comme les lactocoques, de nombreuses souches de lactobacilles sont productrices de bactériocines actives contre la flore bactérienne pathogène **(Collins *et al.,* 2017)**. On peut citer les plantaricines produites par *L. plantarum* qui sont actives contre les bactéries du genre *Listeria* ou encore *Salmonella* **(Chen *et al.,* 2018; Gong *et al.,* 2010)**, les sakacines, également antagonistes de *Listeria* **(Héquet *et al.,* 2007; Katla *et al.,* 2002; Simon *et al.,* 2002)** ou encore les salivaricines affectant notamment les genres *Listeria*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, ou encore *Bacillus* **(Barrett *et al.,* 2007; Therdtatha *et al.,* 2016)**.

Tableau 3 : Exemples de ferments de biopréservation de matrices lactées commercialisés à activité contre levures et moisissures contenant des *Lactobacillus*

Références commerciales	**Matrices d'application**	**Activité**	**Composition microbiologique**	**Entreprise**
BIOPROX ® P 94	Produits laitiers fermentés à basse température	Contre moisissures	*Lactobacillus plantarum*	BIOPROX
BIOPROX® SP 86	Fromâge à pates molles	Contre levures, moisissures et bactéries	*Lactobacillus spicheri*	BIOPROX
BIOPROX® RP 80	Produits laitiers fermentés à haute temparéture (yaourt, tvorog)	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus rhamnosus et Lactobacillus plantarum.*	BIOPROX
BIOPROX® P 83	Produits laitiers fermentés à haute temparéture (yaourt, tvorog)	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus plantarum*	BIOPROX
Holdbac YM-B or YM-C	Aliments fermentés et fromage blanc	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus rhamnosus et Propionibacterium freudenreichiisubsp. shermanii*	DuPont Danisco
Holdbac YM-XPM	Produits laitiers fermentés et yaourts	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus plantarum*	DuPont Danisco
Holdbac YM-XPK	Tout type de fromages	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus plantarum*	DuPont Danisco
FreshQ 1 and FreshQ 4	Fromage frais	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus rhamnosus et Lactobacillus paracasei*	CHR Hansen
FreshQ 2	Fromage frais	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus rhamnosus*	CHR Hansen
FreshQ 5	Fromage frais	Contre levures et moisissures	*Lactobacillus paracasei*	CHR Hansen
Befresh	Produits laitiers frais fermentés	Contrôle la croissance de moisissures et levures	*Lactobacillus paracasei* et *Propionibacterium freudenreichiisubsp. shermanii,*	Handary

c. Autres genres

c.1 Le genre Pediococcus

Les bactéries du genre *Pediococcus* sont retrouvées dans la flore naturelle des fromages sans que leur influence réelle lors de la fermentation soit établie **(Whitman, 2009)**. Ils sont cependant utilisés au sein d'autres produits comme « starter culture » notamment dans la fabrication de saucissons. Du point de vue de la biopréservation, les pédiocoques peuvent produire des bactériocines, les pédiocines. Ces bactériocines font partie de la classe IIa, c'est-à-dire de petits peptides (moins de 10 kDa), ne contenant pas de résidus modifiés, avec une séquence consensus YGNGV (Tyrosine-glycine-asparagine-glycine-valine) dans l'extrémité N-terminale et une région C-terminale variable (hydrophobe ou amphiphile) responsable de la reconnaissance des cellules cibles **(Porto *et al.,* 2017)**. Ces bactériocines sont actives notamment contre *Listeria.* Quelques études rapportent l'activité antifongique de certaines souches de *Pediococcus*, notamment celle de *P. pentosaceus* contre *Fusarium graminearum* **(Sellamani *et al.,* 2016)** ou encore contre *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae,* sur des tranches de fromages **(Muhialdin *et al.*, 2011)**.

c.2 Le genre Leuconostoc

Au sein du genre *Leuconostoc*, l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* est la seule utilisée dans l'industrie laitière comme ingrédient technologique pour la texturation et pour la production d'arômes dans les produits laitiers tels que les fromages, le lait fermenté ou encore le beurre **(Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004)**. La production de CO_2 par leur métabolisme permet la création de « trous » dans les fromages, caractéristiques notamment des préparations de type emmental. La production de ces trous facilite la colonisation par *P. roqueforti* dans les fromages à pâte persillée. En biopréservation, ce genre est utile contre certaines bactéries à gram positif grâce à la sécrétion de nombreuses bactériocines dont la mésentéricine Y105 ou 52A appartenant à la sous-classe IIa, actives contre le genre *Listeria* notamment **(Hechard *et al.,* 1992; Revol-Junelles *et al.,* 1996)**. Une étude a montré une activité de *Leuconostoc mesenteroides* L1 contre *P. commune* et *Y. lipolitica* en yaourt, cependant plus faible que celles des souches de lactobacilles sélectionnées lors de ces travaux **(Ouiddir *et al.,* 2019)**.

Cette souche était plus active que celles de *Lactobacillus* dans les matrices de panification.

2. Critères de sélection des organismes bioprotecteurs

Pour leur utilisation par des industriels, les cultures de biopréservation doivent répondre à certains critères : résister aux procédés de fabrication, s'implanter dans l'aliment, inhiber la flore indésirable ciblée, ne pas présenter de risque microbiologique pour le consommateur et ne pas altérer les propriétés organoleptiques des produits **(Denis *et al.,* 2013).**

a. Criblage de souches d'intérêts

Pour mettre en évidence une activité antimicrobienne, l'approche classique consiste à cribler en laboratoire un ensemble de souches isolées d'environnements naturels, ou directement des produits alimentaires, contre la croissance des microorganismes cibles **(Cheong *et al.,* 2014; Crowley *et al.,* 2012; Inglin *et al.,* 2015; Magnusson *et al.,* 2003)**. C'est seulement dans un second temps que les souches les plus pertinentes sont testées dans les aliments. Cette méthodologie permet de gagner du temps lors de la recherche de souche d'intérêt cependant, elle ne garantit pas la possibilité d'utilisation dans le produit final. En effet, les souches sélectionnées doivent pouvoir se développer au sein de la matrice alimentaire. Or les conditions de culture en laboratoire sont optimales et donc possiblement éloignées de l'application industrielle. En outre, ces souches doivent produire leurs molécules antifongiques en quantité suffisante pour inhiber leurs cibles *in situ*.

Pour s'affranchir des différences entre milieux de laboratoire et industriel, Garnier et son équipe ont décrit une technique de criblage de souches d'intérêt en plaques 24 puits dans une matrice mimant la composition d'un fromage **(Garnier *et al.,* 2018)**. Lors de ce screening, un rétentat de lait écrémé standardisé a été utilisé comme matrice. L'ajout d'un ferment d'acidification contenant *L. lactis* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *lactis* a été réalisé à 6 $\log_{10}$UFC/mL ainsi que de présure et d'un indicateur de pH coloré (Litmus) avant une incubation de 3 jours à 20°C. L'activité antifongique de 23 LAB et de 44 fermentats en lait de LAB a été évaluée

visuellement dans cette matrice contre la croissance, à 12°C pendant 8 jours, de quatre cibles fongiques isolées de produits laitiers : *Mucor racemosus* UBOCC-A-116002, *Penicillium commune* UBOCC-A-116003, *Galactomyces geotrichum* UBOCC-A-216001 et *Yarrowia lipolytica* UBOCCA-216006. Cette méthodologie s'est révélée reproductible et promet l'analyse de 1 600 essais par semaine.

b. Innocuité des souches

Les industriels ont le devoir de garantir la sécurité microbiologique des aliments. Il est donc nécessaire de garantir l'innocuité des ferments incorporés. La réglementation actuelle n'est pas clairement établie en ce qui concerne l'ajout de ces ferments. Cependant, la FDA a mis en place aux États-Unis un système conférant le statut GRAS (Generally recognized as safe) aux micro-organismes utilisables dans l'alimentation. En Europe, l'EFSA (European Food Safety Authority) joue ce rôle en attribuant le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) aux microorganismes, en vue de leur autorisation de mise sur le marché. Son obtention s'appuie sur quatre critères : l'identification de la souche, l'état de connaissance, le type d'application et l'évaluation de sa pathogénicité. La demande de cette autorisation n'est pas nécessaire pour les ferments dits « traditionnels » car, étant utilisés de longue date, ils sont considérés comme sans danger pour l'homme. Pour les autres, l'évaluation par l'EFSA suit le règlement 1997/258/EC. La liste QPS comprend des bactéries lactiques des genres *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Corynebacterium, Streptococcus, Oenococcus*, ainsi que d'autres bactéries à gram positif comme certaines espèces des genres *Bifidobacterium, Propionibacterium* ou *Bacillus*.

Il est donc nécessaire avant toute utilisation de réaliser une identification des souches sélectionnées (par emple un séquençage de l'ADNr 16S et analyse du polymorphisme par MLST pour une identification plus fine de l'espèce). L'espèce ainsi identifiée ne doit pas être reconnue comme pathogène, et donc, ne produire ni toxines ni posséder de gènes de virulence contre l'homme. La présence de gène de résistance aux antibiotiques, en particulier sur des éléments génétiques mobiles, est également proscrite car des transferts génétiques entre souches bactériennes peuvent avoir lieu. Par exemple, la souche *L. lactis* subsp. *lactis* K214, isolée dans

un fromage au lait cru, possède le plasmide pK214, porteur des gènes de résistance au chloramphénicol, à la streptomycine, à la tétracycline et codant pour une pompe à efflux **(Wang *et al.,* 2012)**.De même, la souche *L. plantarum* M345, également isolée dans un fromage au lait cru, possède le plasmide pLFE1, conférant une résistance à l'érythromycine **(Wang *et al.,* 2012)**. Ces plasmides peuvent être transférés à une large gamme d'hôtes comme les espèces pathogènes *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes* et donc représenter un risque pour les consommateurs.

Enfin, la production d'amines biogènes comme l'histamine, la putrescine, la tyramine ou encore la phényléthylamine peut être à l'origine d'intoxications alimentaires. Certaines espèces du genre *Lactobacillus* sont notamment citées pour produire ce type de molécules dans des matrices laitières telles que fromages ou yaourts **(Buňková *et al.,* 2010; Leuschner *et al.,* 1998; Yılmaz and Gökmen, 2017).** Il est donc nécessaire de contrôler cette production au sein des produits laitiers.

c. Contraintes industrielles

Quelle que soit l'application, l'utilisation de ferments nécessite de disposer de cultures de microorganismes viables, fraiches, congelées ou lyophilisées. D'un point de vue industriel, un critère essentiel pour l'obtention de ces ferments sera leur aptitude à générer rapidement de la biomasse en fermenteur en grande quantité dans des conditions peu coûteuses **(Denis *et al.,* 2013)**. Pour ce faire, les conditions optimales physico-chimiques devront être déterminées (nutriments, température, pH, aération, pression, …).

Par la suite, ces cultures sont le plus souvent concentrées par centrifugation pour obtenir des titres compris entre 10^{10} et 10^{11} UFC/g. Il faut donc que les bactéries survivent à ce traitement mais aussi à leur stockage **(Denis *et al.,* 2013)**. Différents facteurs peuvent intervenir sur la résistance des ferments, comme les conditions de préparation des cultures (concentration, fermentation, cryoprotection), de congélation, de lyophilisation, de stockage, de décongélation ou de réhydratation **(Carvalho *et al.,* 2003; Kim and Bhowmik, 1990; Polo *et al.*, 2017; Strasser *et al.,***

2009). Ainsi, l'un des critères de sélection de souches commercialisable par les industriels consistera à vérifier la survie des ferments à ces traitements.

C. Activité antifongiques des bactéries lactiques

Comme vu précédemment, les LAB sont utilisées depuis des millénaires pour conserver les aliments, notamment par la fermentation. L'acide lactique est le métabolite majoritairement produit par l'ensemble des LAB et responsable de la chute de pH dans les aliments, lors de leur croissance. Cet acide est décrit depuis plusieurs décennies comme antifongique. Cependant, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde, non pas sur l'effet individuel d'une molécule, mais sur l'effet synergique d'un ensemble de métabolites antifongiques. Parmi les classes de molécules antifongiques décrites, on retrouve : les acides organiques (dérivant du métabolisme central du carbone, de la synthèse des acides gras, des acides aminés, etc), les peptides (produits par les LAB ou issus de la dégradation de la matrice), les dipeptides cycliques, la reuterine, le dioxyde de carbone, le diacétyle, le preroxyde d'oxygène, l'éthanol, et d'autres molécules telles que la δ-dodécalactone, la mévalonolactone, la méthylhydantoine, etc (Figure 9) **(Siedler *et al.*, 2019)**.

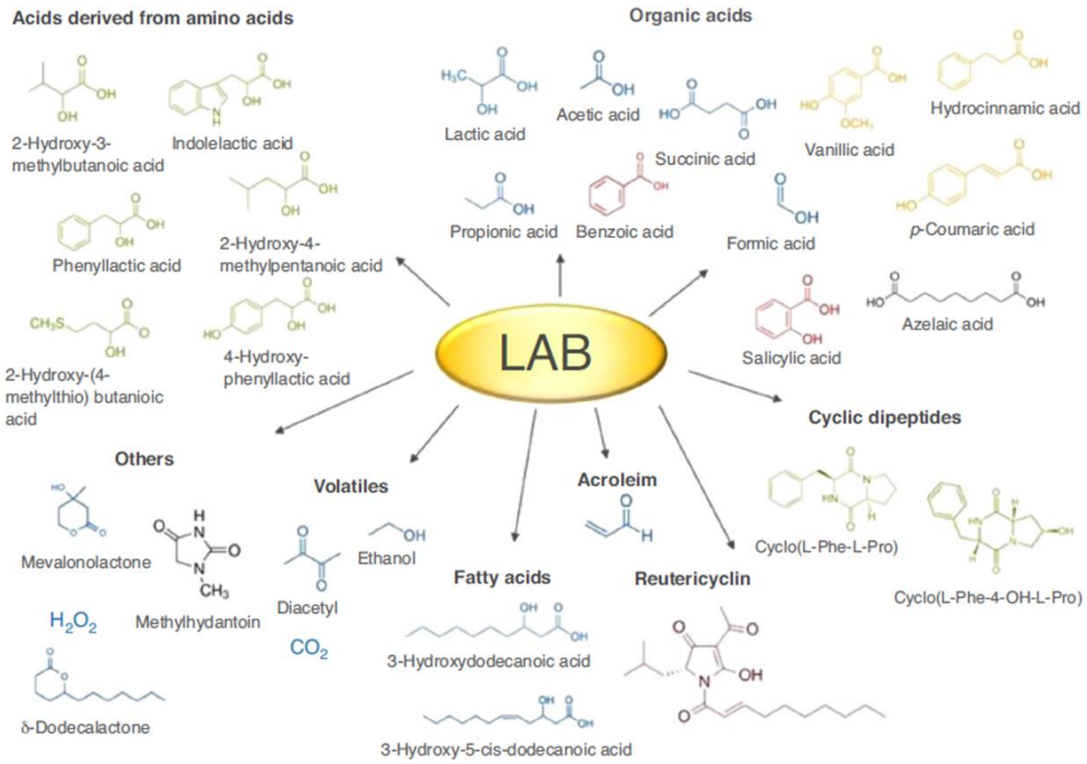


Figure 9 : Structures chimiques de divers composés anti-fongiques retrouvés dans les surnageant de LAB **(Siedler *et al.*, 2019)**.
Les sources des métabolites sont indiquées de différentes couleurs : métabolisme central du carbone ou synthèse des acides gras (bleu) ; composés dérivés d'acides aminés (vert) ; composés dérivés d'acides aminés et de synthèse d'acides gras (violet) ; composés dérivés de la bioconversion à partir de composés extracellulaires (rouge) ; biosynthèse inconnue (noir) ; probablement non synthétisé par les bactéris lactique mais retrouvé dans les surnageants après la fermentation (jaune).

1. Les acides organiques

a. L'acide lactique

L'acide lactique est le métabolite final de la fermentation lactique qui est utilisée par les LAB pour produire de l'énergie (Figure 10). Il s'agit d'un monoacide faible avec un pKa de 3,86. Sous sa forme protonée, l'acide lactique peut traverser les membranes plasmiques pour se dissocier par la suite à l'intérieur des cellules. Cette dissociation libère des protons, ce qui acidifie le cytoplasme **(Axelsson, 1990; Piard and Desmazeaud, 1991)**. Afin de contrer la diminution du pH cytoplasmique cellulaire, la cellule utilise de l'énergie pour expulser ces protons, ce qui diminue la vitesse de croissance et engendre une perturbation des les systèmes de régénération de l'ATP et donc de la croissance ansi que le transport des nutriments comme les acides animés (**Cassio *et al.*, 1987; Eklund, 1980; Freese, 1973; Sheu**

***et al.,* 1975; Ten Brink *et al.,* 1985; Ten Brink and Konings, 1980)**. La structure des protéines, les acides nucléiques, les phospholipides et les systèmes enzymatiques peuvent également être affectés.

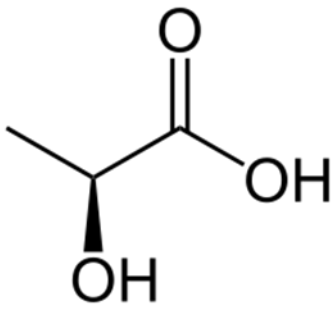


Figure 10 : Représentation schématique de l'acide lactique

L'acide lactique possède une CMI relativement élevée en fonction des cibles. Une étude publiée en 2001 montre les capacités d'inhibition de cet acide à 25 g/L contre une souche de *S. cerevisiae* **(Narendranath *et al.,* 2001a)**. Une autre étude portant sur l'impact de l'acide lactique sur la croissance de souches d'*A. flavus* a montré des CMI différentes selon les souches, comprises entre 32,2 g/L (pH 2,74) et 36,5 g/L (pH 2,69) **(Leon Peláez *et al.,* 2012)**. Contre d'autres espèces de moisissures, la CMI obtenue contre une souche du genre *Mucor circinelloides* était de 25 g/L tandis qu'elle était plus faible contre des souches de *A. flavus* et *Fusarium verticillioides* avec une CMI de 12,5 g/L **(Quattrini *et al.,* 2019)**.

b. L'acide acétique

Lors de leur croissance, les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent de l'acide acétique en quantité plus ou moins élevée (Figure 11). Le pKa de cet acide est de 4,75. Ainsi, l'efficacité de cet acide est supérieure celle de l'acide lactique puisque lors d'une diminution de pH, il sera plus rapidement majoritairement sous forme non dissociée. Cependant, l'action de cet acide est tributaire de la production de l'acide lactique puisque celui-ci module le pH du milieu, et donc sa proportion de formes non dissociées.

Le mécanisme d'action de cet acide est différent de l'acide lactique, notamment chez *S. cerevisiae*. Une étude a montré que l'acide acétique ne diminue pas le pH intracellulaire de *S. cerevisiae* en dessous de 12 g/L **(Narendranath *et al.,***

2001b). Ainsi, le maintien du pH intracellulaire est coûteux en énergie : 40 à 60% de l'ATP cellulaire pour l'expulsion des protons **(Pampulha and dias 2000)**. La réduction de la croissance de *S. cerevisiae* par l'acide acétique résulte donc de la déviation accrue de l'énergie de la croissance au maintien de l'homéostasie du pH intracellualire.

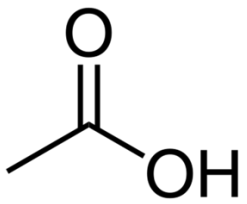


Figure 11 : Représentation schématique de l'acide acétique

Contre la croissance de *S. cerevisiae*, la CMI de cet acide est de 6 g/L **(Narendranath *et al.*, 2001a)**. Cette CMI est inférieure contre *A. flavus* avec 2,5 g/L (pH 4,62) **(Leon Peláez *et al.*, 2012)**. Dans cette même étude, l'effet synergique de l'acide acétique avec l'acide lactique a été démontré : seulement 7 g/L d'acide lactique et 1,9 g/L d'acide acétique pour un pH de 3,4 permettent d'inhiber la croissance d'*A. flavus*.

c. L'acide propionique

L'acide propionique possède également une activité antifongique (Figure 12). Cet acide est principalement produit par des bactéries de type *Propionibacterium*, utilisé aussi dans les produits laitiers de type fromage à pâte pressée cuite comme par exemple l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* dans les emmentals. Comme pour les acides lactique et acétique, il peut diffuser à l'intérieur des cellules. Sa valeur de pKa est supérieure à celle de l'acide acétique (4,87). De plus, une étude menée en 2016 sur *C. albicans* a montrée, suite à l'exposition à cet acide, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induisant un stress oxydant dans les cellules et l'activation de la métacaspase, induisant la mort cellulaire **(Yun and Lee, 2016)**.

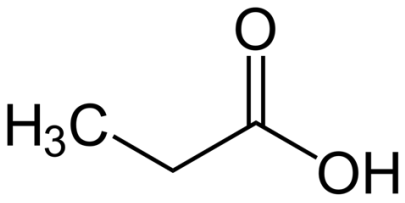


Figure 12 : Représentation schématique de l'acide propionique

Dans une étude réalisée contre la croissance de *F. graminearum*, une CMI de 0,6 g/L d'acide propionique a été rapportée **(Corsetti *et al.,* 1998)**. Dans une autre étude, les valeurs de CMI de cet acide en fonction du pH ont été analysées contre la croissance de trois levures et cinq moisissures **(Lind *et al.,* 2005)**. Ainsi, par exemple, la CMI contre *R. muciliginosa* est passée de 37 g/L (pH 5) à 0,6 g/L (pH 3). Cette diminution de CMI consécutive à celle du pH du milieu montre ainsi le potentiel d'une synergie entre l'acide lactique produit par les LAB et l'acide propionique produit par d'autres bactéries comme les bactéries propioniques.

d. Acides dérivés d'acides aminés

d.1 Acide phényllactique et Acide 4-hydroxy-phényllactique

L'acide phényllactique (PLA) (Figure 13) a fait l'objet de nombreuses études pour ses propriétés antibactériennes mais aussi antifongiques. Cet acide est issu de la dégradation de la phénylalanine par l'action successive d'une amino-acide transférase puis d'une pyruvate-réductase **(Chaudhari, 2016; Dao *et al.,* 2019)**. L'acide 4-hydroxyphényllactique (*p*-OH-PLA) (figure 14) est issu de la dégradation de la tyrosine en acide 4-hydroxyphénylpyruvique **(Dao *et al.,* 2019; Mu *et al.,* 2010)**. Ce composé a été isolé pour la première fois dans le surnageant actif de la souche *L. plantarum* 21B dans un bouillon d'hydrolysat de farine de blé avec l'acide phényllactique **(Lavermicocca *et al.,* 2000).**

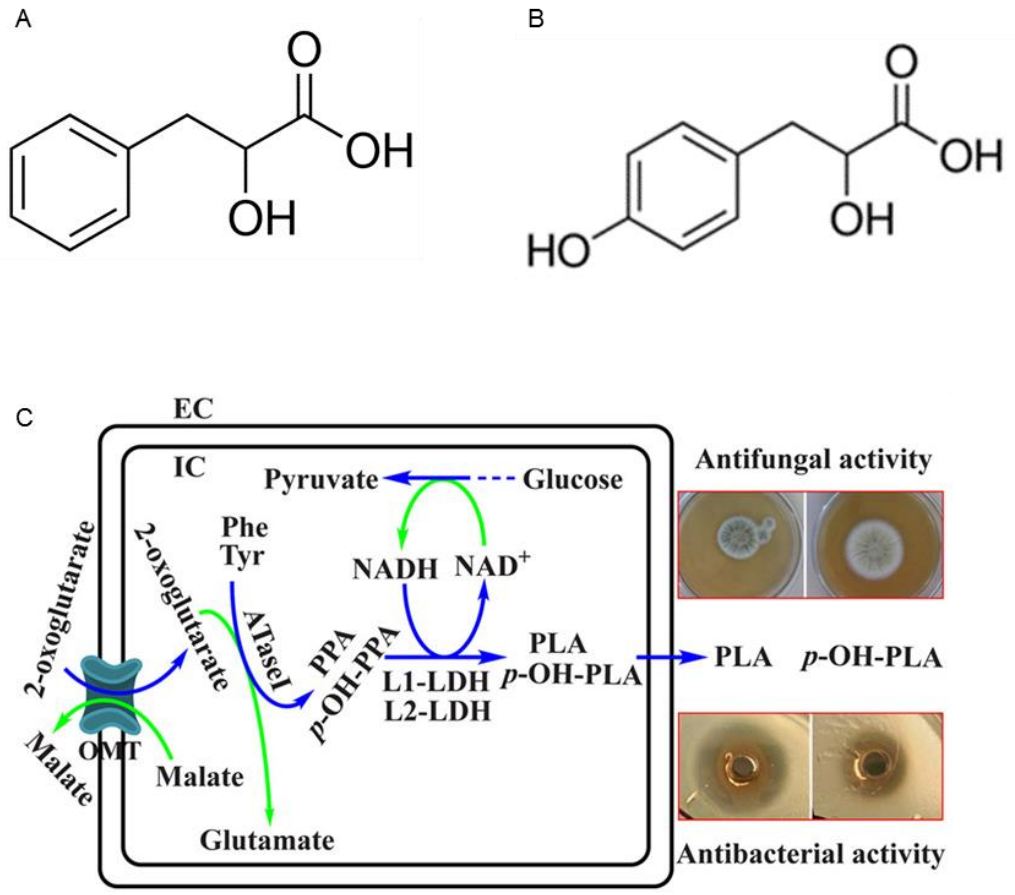


Figure 13 : Représentation schématique de l'acide phényllactique (A) et de l'acide 4-hydroxyphényllactique (B). Schéma de biosynthèse de ces deux acides, lié à la fermentation du glucose et au catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine, (issus de **Dao *et al.*, 2019**) (C)

La production de l'acide phényllactique par les bacétries lactiques a été décrite pour la première fois par Lavermicocca et collaborateurs en 2000. Il a été isolé à partir du surnageant d'une souche *L. plantarum* cultivée dans un bouillon d'hydrolysat de farine de blé. La CMI de cet acide contre des souches d'*Aspergillus*, d'*Eurotium*, d'*Endomyces* et de *Monilia* a été estimée à 50 g/L tandis que contre deux souches de *Penicillium*, cette CMI a été évaluée à 166 g/L **(Lavermicocca *et al.*, 2000)**. Une autre étude a suivi en 2002 par Ström et son équipe, mettant en évidence la production de cet acide par une autre souche de *L. plantarum* (MiLAB 393) en milieu MRS. Une CMI inférieure de 7,5 g/L a été reportée contre *A. fumigatus* et *P. roqueforti* **(Ström *et al.*, 2002)**. La suite de l'étude concernant l'activité de PLA a montré un lien entre le pH du milieu et l'activité de cet acide **(Lavermicocca *et al.*, 2003)**. En effet, une activité maximum avait été retrouvée à pH 2,6 contre *A. niger* tandis que celle-ci était réduite de moitié à un pH de 5,5 à une

concentration de 10 g/L. Par la suite, l'effet synergique entre le PLA et les acides lactique et acétique contre la croissance d'*A. niger* a été établie à des concentrations de 5 g/L de PLA, 15,8 g/L d'acide lactique et de 0,67 g/L d'acide acétique **(Lavermicocca *et al.,* 2003)**.

D'autres souches de LAB se sont révélées productrices de PLA : *L. alimentarius, L. rhamnosus, L. sanfranciscensis, L. hilgardii*, *L. brevis, L. acidophilus*, *L. casei, L. reuteri, L. sakei, L. fermentum, Leuconostoc citreum* et *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* **(Cortés-Zavaleta *et al.,* 2014; Valerio *et al.,* 2004)**. Dans les surnageants des souches productrices de PLA en milieu MRS, des taux compris entre 3,4 et 45 mg/L ont été retrouvés **(Cortés-Zavaleta *et al.,* 2014)**. De même, le suivi de la synthèse du PLA au cours du temps par une souche de *L. casei* a montré une production en phase stationnaire de croissance **(Cortés-Zavaleta *et al.,* 2014)**. Une autre étude a montré que la modulation du milieu de culture permet une augmentation de la production de cet acide notamment par l'ajout de précurseur comme l'acide phénylpyruvique ou la phénylalanine **(Li *et al.,* 2007; Schmidt *et al.,* 2018; Valerio *et al.,* 2016).** La modulation de la production l'acide phényllactique par *L. reuteri* R29 a également été montrée dans un modèle alimentaire *in-situ* de panification **(Schmidt *et al.,* 2018)**.

Le mécanisme d'action exact de l'acide phényllactique est mal connu. Une étude a montré qu'il inhibe la sporulation chez *A. niger* et *P. roqueforti* (à une concentration légèrement inférieure à la CMI) et induit la surexpression d'un gène de stress : *phiA* **(Svanström *et al.,* 2013)**.

Dans cette même étude, la CMI estimée pour cet acide est supérieure à celle de l'acide phényllactique avec 132 g/L contre la croissance d'*Endomyces fibuliger*.

d.3 Acide benzoïque

L'acide benzoïque est l'un des agents de conservation les plus utilisés dans l'industrie alimentaire (E210 et E211) (Figure 14). Plusieurs espèces de bactéries lactiques sont décrites pour produire naturellement cet acide au sein des matrices laitières : *L. acidophidus, L. bulgaricus, L. rhamnosus, L. casei ; L. paracasei, L. reutri. L. plantarum, L. helveticus, L. lactis, Streptococcus thermophilus* **(Han *et al.,***

2016; Yu *et al.*, 2016). Des études ont analysé la production de l'acide benzoïque lors de la fermentation de lait par des ferments commercialisés. Des concentrations en acide benzoïque ont été retrouvés jusqu'à 14,55 mg/kg **(Park *et al.*, 2017)**.

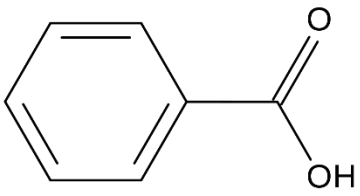


Figure 14 : Représentation schématique de l'acide benzoïque

Plusieurs voies de biosynthèse de l'acide benzoïque existent chez les LAB (Figure 15). Cette synthèse peut avoir lieu lors de la dégradation de la phénylalanine, ou bien la conversion de l'acide hippurique (retrouvé dans le milieu de culture) ou du benzaldéhyde **(Sieber *et al.*, 1995)**.

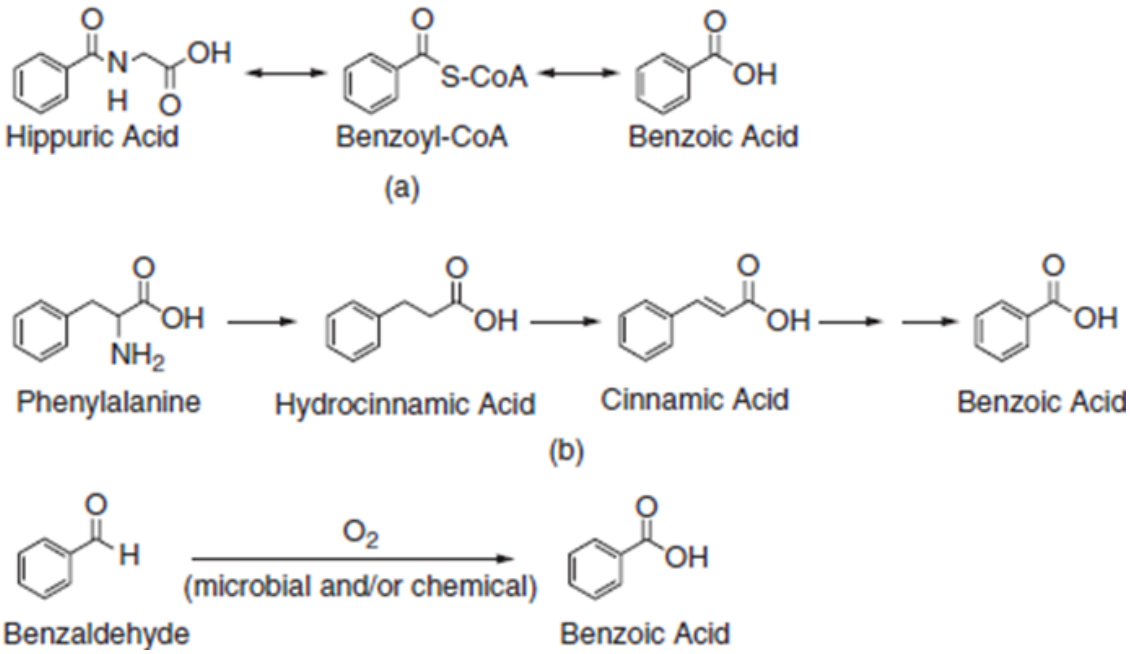


Figure 15 : Biosynthèse de l'acide benzoïque par les LAB dans les produits laitiers (adapté de Sieber *et al.* 1995).

Les CMI reportées pour l'acide benzoïque varient selon les cibles. Pour les levures, des CMI de 100 mg/L ont été rapportées contre des souches du genre *Rhodoturula* sp **(Chipley, 2005)**. Ces valeurs sont plus élevées contre des souches du genre *Candida krusei* (entre 300 et 700 mg/L) ou encore contre *D. hansenii* (500

mg/L) à un pH de 4,8 **(Chipley, 2005)**. Contre les moisissures, des concentrations plus élevées en acide benzoïque sont nécessaires. Des CMI, allant de 30 à 2000 mg/L ont été rapportées contre diverses souches de *Penicillium* à des pH compris entre 2.6 et 5 **(Chipley, 2005)**. Contre *Mucor racemous*, on retrouve une CMI allant de 30 à 120 mg/L. Certaines souches d'*Aspergillus* se sont révélées résistantes à cet acide (CMI > 4 g/L) tandis que d'autres sont inhibées entre 20 et 300 mg/L en fonction du pH du milieu **(Chipley, 2005)**.

Comme pour les autres acides, la forme protonée est la forme la plus active **(Cruess and Richert, 1929)**. Il a été rapporté, à des concentrations légèrement inférieures à la CMI (1,2 g/L) chez *Zygosaccharomyces bailii*, une inhibition de la fermentation suivie d'une diminution de l'ATP dans les cellules et une accumulation du benzoate intracellulaire **(Chipley, 2005)**. D'autres études ont montré l'effet de l'acide benzoïque sur le trafic membranaire intracellulaire et une inhibition complète de la microautophagie **(Hazan *et al.,* 2004; Winter *et al.,* 2008)**.

e. Les acides gras

De nombreux acides gras produits par les LAB ont été décrits dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Il s'agit d'acides gras de toutes tailles possédant ou non des insaturations, des hydroxylations ou encore des méthylations.

e.1 Acides gras saturés

Parmi les acides gras saturés, l'acide caprique (acide décanoïque ou C10) et l'acide laurique (acide dodécanoïque ou C12) ont montré des propriétés antifongiques contre diverses cibles. Sur *C. albicans*, l'acide caprique a induit la mort cellulaire d'environ 77 % de la population après un traitement de 10 min à 37°C à 1,7 g/L **(Bergsson *et al.,* 2001)**. Dans cette même étude, l'acide laurique a induit une inhibition de 26 % et 71,8% après ce même traitement à 1 et 2 g/L. Dans une autre étude, la CMI de l'acide caprique en association à 600 mg/L d'acide acétique a été évaluée contre sept souches fongiques contenant des levures du genre *Rhodoturula* et *Kluyveromyces* ainsi que des moisissures du genre *Penicillium* ou encore *Aspergillus* **(Sjogren *et al.,* 2003)**. La CMI la plus faible reportée est de 5 mg/L contre *Rhodoturula* et la plus forte de 100 mg/L contre deux souches d'*Aspergillus*.

L'effet antifongique de l'acide hexadécanoïque (acide palmitique ou C16) est également décrit dans plusieurs études. La production de cet acide est reportée pour la souche *Lactobacillus parafarraginis* ZH1 dans de l'ensilage **(Liu *et al.,* 2018)**. Dans cette étude, une CMI de 2 g/L a été retrouvée contre deux souches de levures en milieu YPD gélosé : *Candida krusei* et *Pichia membranefaciensas*.

e.2 Acides gras insaturés

L'acide (9Z, 12Z) -octadéca-9,12-diénoïque (linoléique ou C18:2) a été détecté dans du levain fermenté par les souches *L. hammesii* DSM16381 et *L. sanfranciscensis* ATCC 27051. La CMI retrouvée en milieu MRS contre la croissance d'une souche d'*A.niger* était de 4g/L **(Black *et al.,* 2013a)**.

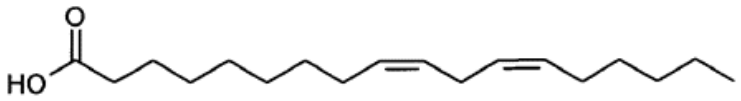


Figure 16 : Représentation schématique de l'acide (9Z, 12Z) -octadéca-9,12-diénoïque

e.3 Acides gras hydroxylés

Le caractère antifongique de certains acides gras hydroxylés a aussi été mis en évidence. Dans une étude suédoise, la production de quatre 3-hydroxy-acides a été montrée dans un surnageant de la souche *L. plantarum* MiLAB 14 en milieu MRS : l'acide 3-(R)-hydroxydécanoïque (3-OH-C10), l'acide 3-(R)-hydroxydodécanoïque (3-OH-C12), l'acide 3-hydroxy-5-cis-dodécènoïque (3-OH-C12 :1) et l'acide 3-(R)-hydroxytétradécanoïque (3-OH-C14)**(Sjogren *et al.,* 2003)**.La CMI de ces différents acides gras en association avec 10 mM d'acide acétique a été évaluée sur sept souches fongiques dont *P. roqueforti*, *A. fumigatus*, *R. mucilaginosa* ou encore *Kluyveromyces marxianus*. Pour les acides 3-OH-C10 et 3-OH-C12, la CMI était comprise entre 10 et 100 mg/L, avec une sensibilité plus importante pour les levures.

Cette même équipe a publié quelques années plus tard une synthèse de molécules antifongiques retrouvées dans un ensilage d'herbe inoculé avec deux souches de *L. plantarum* **(Broberg *et al.,* 2007)**. L'activité de l'acide 3-OH-C10 a évaluée avec des tests antifongiques en présence d'acide lactique à 100 mM à pH

4,2. Ces tests montrent une CMI de 100 mg/L contre *Pichia anomala* et *A. fumigatus*. Contrairement à l'étude précédente, la CMI contre *P. roqueforti* est supérieure à 100 mg/L **(Broberg *et al.,* 2007)**. Un autre acide hydroxylé a été retrouvé dans ce milieu : l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque. La valeur de sa CMI contre *P. anomala*, *P. roqueforti* et *A. fumigatus* était de 10 g/L à pH 4.2, en association avec 100 mM d'acide lactique, ce qui est 100 fois plus élevé par rapport à l'acide 3-OH-C10. L'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque a été retrouvé dans les surnageants actifs des souches *L. plantarum* VE56 et *Weissella paramesenteroides* LC11 en milieu MRS contre trois souches d'*Aspergillus* et une souche de *P. crustosum* **(Ndagano *et al.,* 2011)**.

Une autre étude a montré la présence de nombreux acides gras hydroxylés dans du levain fermenté avec deux souches de *Lactobacillus* **(Black *et al.*, 2013b)**. Ainsi, l'acide 10-hydroxy-12-octadécenoïque (10-OH-C18 :1) (synthétysé à partir de l'acide linoléique par *L. hammesi* DSM 16381) présente une activité antifongique avec une CMI de 0,7 mg/L contre une souche d'*A. niger* et de 100 µg/mL contre une souche de *P. roqueforti* **(Black *et al.*, 2013a, 2013b)**. Les acides 13-hydroxy-9,11-octadecadiènoïque (coriolique) et 12-hydroxy-9-octadecènoique (ricinoléique) ont également été retrouvé avec une CMI de 0,7 et 2,4 g/L contre *A. niger* **(Black *et al.,* 2013a)**. Dans cette étude, il a été observé que la présence d'un groupement hydroxylé et d'une insaturation était un facteur important pour l'activité antifongique de l'acide gras.

2. Les composés peptidiques

a. Peptides isolés en milieu MRS

Certaines études en milieux MRS ont révélé la présence de composés protéiques dans le surnageant de culture de lactobacilles. En 2001, Magnusson et Schnurer ont mis en évidence l'activité de la souche *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3. Cette activité était corrélée au pH du surnageant (entre 3 et 4,5) et à la présence d'un ou plusieurs composés protéiques d'une taille d'environ 3 kDa **(Magnusson and Schnürer, 2001)**. Une étude grecque étudiant le surnageant de souches de lactobacilles actives contre la croissance de *Penicillium* sp. a également montré la perte d'activité lors d'un traitement enzymatique par la tryspine, la pepsine,

l'α-chymotrypsine ou la protéinase K et donc la nature peptidique du (des) composé(s) actif(s) **(Voulgari *et al.,* 2010)**. Cette même année, une autre étude constatait le même effet de protéases sur l'activité du surnageant de la souche *L. brevis* PS1 **(Mauch *et al.,* 2010)**. En effet, l'action de la protéinase K et de la pronase E ont réduit l'activité anti-germination de ce surnageant de culture. Cependant, il n'y est pas rapporté l'identification exacte de ce(s) composé(s). En 2013, la digestion enzymatique des composés protéiques du surnageant de la souche *L. fermentum* CRL 251 a mis en évidence une perte d'activité de 50% contre *A. niger* CH101 **(Gerez *et al.,* 2013)**. Le fractionnement de ce surnageant de culture par ultrafiltration a démontré la présence d'un ou plusieurs composés antifongiques d'une taille inférieure à 10 kDa.

En 2014, des peptides isolés de la souche *L. plantarum* LR14, nommés AMPs LR14, ont induit une inhibition de croissance de quatre moisissures : *A. niger, M. racemosus, P. chrysogenum, et Rhisopus stolonifer* **(Gupta and Srivastava, 2014)**. Ce mélange contient 4 peptides d'une taille inférieure à 1 kDa. Il inhibe la germination de spores des quatre souches cibles à plus de 80% ainsi que la formation d'hyphes à plus de 60% lors d'un ajout de 2 g/L. Une étude malaisienne rapporte la présence du peptide FPSHTGMSVPPP dans le surnageant de culture de la souche *L. plantarum* IS10 **(Muhialdin *et al.,* 2016)**. Ce peptide a montré à 5 g/L une inhibition d'environ 40% et 60% de *A. flavus* MD3 et *Eurotium rubrum* MD5 respectivement et d'environ 40% de *P. roqueforti* MD4 à 2,5 g/L. L'année suivante, le peptide SGADTTFLTK, présent dans le surnageant de la souche *L. plantarum* CECT 749 a révélé une activité contre *Aspergillus parasiticus* et *Penicillium expansum* **(Luz *et al.,* 2017)** entraînant une perte de viabilité de 73% de *A. parasiticus* et de 58% de *P. expansum* après 48 heures d'exposition.

b. Peptides isolés en matrices laitière

Certains peptides actifs sont issus de la dégradation des protéines de la matrice alimentaire. Dans le lait, la protéolyse de protéines comme la lactoferrine est une source potentielle de peptides actifs **(Fernandes and Carter, 2017).** Elle est principalement dégradée en lactoferricine (Lfcin), peptide possédant une boucle de 18 résidus avec un pont disulfure ainsi que de nombreux résidus chargés

positivement et hydrophobes **(Gifford *et al.,* 2005)**. Dans le lait bovin, la LfcinB a une activité antifongique contre de nombreux genres tels que *Candida, Aspergillus* ou encore *Penicillium* à des CMI comprises entre 3 et 60 mg/L selon le milieu de culture (1% Bactopeptone ou PYG à pH 6,8) **(Bellamy *et al.,* 1994)**. Dans cette étude, l'interaction directe de la LfcinB avait induit la perturbation des membranes fongiques chez *Trichophyton mentagrophytes*.

Des peptides issus de caséines se sont aussi révélés actifs. Un peptide (DMPIQAFLLY) dérivé du clivage de la β-caséine a été récemment identifié dans de la crème fraiche contenant des ferments de biopréservation : une souche de *L. rhamnosus* et une souche *L. paracasei* **(Mcnair *et al.,* 2018)**. Ce peptide s'est révélé actif contre la croissance de la levure *D. hansenii* en matrice laitière.

c. Les dipeptides cycliques

Les dipeptides cycliques, autrement appelés 2,5 dioxopiperazines, sont des dérivés peptidiques décrits pour avoir des propriétés antibactériennes et antifongiques. Leur production par des lactobacilles a été rapportée dans plusieurs publications **(Kwak *et al.,* 2014; Magnusson *et al.,* 2003; Niku-Paavola *et al.,* 1999; Ström *et al.,* 2002)** (Figure 17).

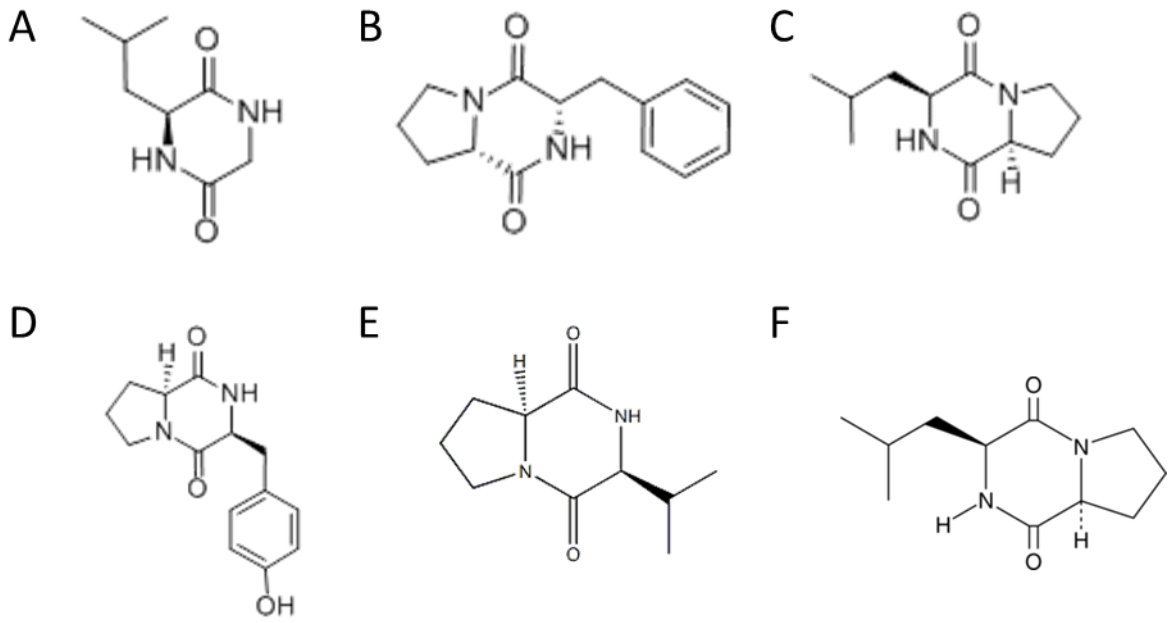


Figure 17 : Représentation schématique de dipeptides cycliques : cyclo (L-Gly-L-Leu)(A), cyclo (L-Phe-L-Pro)(B), cyclo(L-Leu-L-Pro)(C), cyclo(L-Pro-L-Tyr)(D), cyclo(L-Pro-L-Val)(E) et la cyclo(L-pro-L-Pro)(F).

La cyclo(L-Leu-L-Gly) a été retrouvée dans une fraction active contre *Fusarium avenaceum* du surnageant de la souche *L. plantarum* VTT E-78076 avec de l'acide benzoïque, de la méthylhydantoïne, et de la mévalonolactone **(Niku-Paavola *et al.,* 1999)**. En 2002, Ström et son équipe ont mis en évidence la production de cyclo(L-Phe–L-Pro) et de cyclo(L-Phe–trans-4-OH-L-Pro) par la souche *L. plantarum* MiLAB 393. Dans cette étude, la cyclo(L-Phe–L-Pro) a montré une CMI de 20 g/L contre *A. fumigatus* et *P. roqueforti* à un pH de 4. La souche *L. plantarum* MiLAB 393 est également productrice de PLA (voir paragraphe II-C-1-d.1). L'association du PLA et de la cyclo(L-Phe–L-Pro) a diminué leur CMI à 5 et 10 g/L à pH 4 respectivement. Cette diminution conforte l'idée d'une synergie de molécules antifongiques dans les surnageants de culture des LAB. En 2003, la présence de cyclo(L-Phe–L-Pro) et de cyclo(L-Phe–trans-4-OH-L-Pro) a également été mise en évidence dans le surnageant d'une autre souche : *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 **(Magnusson *et al.,* 2003)**. Ces deux peptides cycliques ont été retrouvés dans deux fractions actives contre *A. fumigatus*, et notamment en mélange avec l'acide phényllactique pour la cyclo(L-Phe–trans-4-OH-L-Pro).

En 2012, une équipe chinoise a fractionné le surnageant de la souche *L. casei* AST18 issu d'un milieu MRS et actif contre une souche de *Penicillium* sp. **(Li *et al.,* 2013)**. Deux fractions se sont révélées actives, la première comprenant de l'acide lactique et la deuxième comprenant la cyclo-(L-Leu-L-Pro). Cependant, leur implication respective dans l'inhibition de croissance n'est pas rapportée.

En 2014, Kwak et collaborateurs ont montré la présence de cinq dipeptides cycliques dans le surnageant de la souche *L. plantarum* LBP-K10 : cyclo(L-Tyr-L-Pro), cyclo(L-Val-L-Pro), cyclo(L-Ser-L-Pro), cyclo (L-Leu-L-Pro) et -cyclo (L-Phe-L-Pro). Ces cinq molécules ont montré une CMI contre *Ganoderma boninense* comprises entre 1,4 et 2,1 g/L. Le cyclo (L-Phe-L-Pro) a montré également une activité antifongique contre *C. albicans* à 1,6 g/L **(Kwak *et al.*, 2014)**.

Cependant, les CMI mesurées pour les dipeptides cycliques sont très éloignées des quantités effectivement produites par les lactobacilles. En effet, des dosages de quatre dipeptides cycliques ont été effectués dans le surnageant de la souche *L. brevis* R2Δ cultivée en MRS **(Axel *et al.,* 2014)**. Cette étude a rapporté une production de 0,5, 6,8, 9,8 et 14,3 mg/L de cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Phe-L-Pro) et cyclo(L-Met-L-Pro) respectivement.

3. Autres composés

a. Le diactéyle

Le diacétyle est un produit du catabolisme du citrate (Figure 6 et 18). Ce composé est notamment produit en grande quantité par *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis **(Lahtinen *et al.,* 2012)**. Le diacétyle peut également être produit par des lactobacilles dont *L. casei*, *L. brevis, L. plantarum, L. rhamnosus* **(Branen and Keenan, 1971; Chuang and Collins, 1968; El-Gendy *et al.,* 2016; Medina de Figueroa *et al.,* 2001)**.

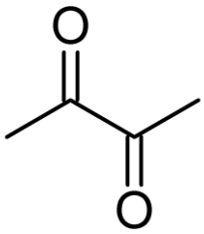


Figure 18 : Représentation schématique du diacétyle

En 2015, une étude danoise a rapporté l'activité antifongique de la souche *L. paracasei* DGCC 2132 contre *Penicillium solitum* DCS 302 et *Penicillium* sp. nv. DCS 1541 dans un yaourt **(Aunsbjerg *et al.,* 2015b)**. En exposant ces deux souches de *Penicillium* à distance à un fermentat d'un milieu synthétique de la souche *L. paracasei* DGCC 2132, une inhibition a été constatée. Elle a été corrélée à la présence de diacétyle présent à 60 mg/L lors du début de stockage de la matrice à 25°C. L'influence seule du diacétyle a été analysée au sein d'un yaourt. Il s'est révélé actif contre *Penicillium* sp. nov DCS 1541 à 45 mg/L mais à une température, relativement élevée pour le stockage, de 25°C pendant 4 jours. Cette étude a également montré l'effet bénéfique de l'association d'un ferment d'acidification commercial avec la souche *L. paracasei* DGCC 2132 sur la production de diacétyle dans un modèle in-situ de yaourt. En effet, celle-ci est alors passée de 3,1 à 13,5 mg/L.

Le mécanisme d'action du diacétyle est mal connu. Aunsbjerg et son équipe ont montré que cette molécule induisait un retard de germination de la souche

Penicillium sp. DCS 1066 d'une quarantaine d'heure ainsi qu'une augmentation de la taille des spores et du nombre de sites de germination **(Aunsbjerg *et al.,* 2015a)**.

b. La reuterine

En 1987, La production d'une molécule antimicrobienne a été détectée chez une souche de *L. reuteri* : la reuterine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde, 3-HPA) **(Chung *et al.,* 1989)** (Figure 19). Cette molécule est produite par la conversion du glycérol en 3-HPA grâce au coenzyme B12 et à la glycérol déshydratase **(Vollenweider and Lacroix, 2004)**.

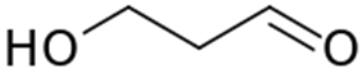


Figure 19 : Représentation schématique du 3-hydroxypropionaldéhyde ou Reuterine

La reuterine s'est montrée active contre plusieurs bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enterica* **(Ortiz-Rivera *et al.,* 2017)** mais aussi contre des espèces fongiques **(Chung *et al.,* 1989; Vimont *et al.*, 2019)**. Dans une étude récente, les CMI de cette molécule ont été évaluées contre diverses souches de moisissures comme *Penicillium* et *Aspergillus* ou de levures comme *Candida*, *Rhodoturula* ou encore *Sacharromyces* **(Vimont *et al.,* 2019)**. Ces CMI se situaient entre 7,4 et 555 mg/L pour les moisissures et levures. Dans cette même étude, la reuterine s'est révélée efficace lors de son incorporation dans des yaourts. En effet, une concentration de 510 mg/L a permis d'inhiber visuellement la croissance de *Mucor racemous* pendant 21 jours de stockage à 4°C.

c. Les lactones

Les lactones sont une famille de composés organiques qui contiennent un groupe cétone lié à un hétérocycle constitué de 3 à 6 carbones. Une étude finlandaise a rapporté l'activité du surnageant de culture de la souche *L. plantarum* VTT E-78076 contre *Fusarium avenaceum* **(Niku-Paavola *et al.,* 1999)**. Le fractionnement du surnageant de culture sur colonne Sephadex G-10, suivi d'une analyse en HPLC, a montré une fraction active contenant plusieurs molécules :

l'acide benzoïque, la méthylhydantoïne, la mévalonolactone et un dipeptide cyclique (cyclo (L-Gly-L-Leu)).

En 2011, Yang et son équipe ont montré la présence de δ-dodécalactone et de cyclo(L-Leu-L-Leu) dans une fraction active du surnageant de culture en milieu MRS de la souche *L. plantarum* AF1. Dans cette étude, la CMI de ce composé a par la suite été évaluée contre sept souches de moisissures dont *Aspergillus* et *Penicillium* et trois *C. albicans*. Ces CMI étaient comprises entre 350 et 850 mg/L mais cependant évaluées à pH 7 sur boite et donc probablement surestimées **(Yang *et al.*, 2011)**.

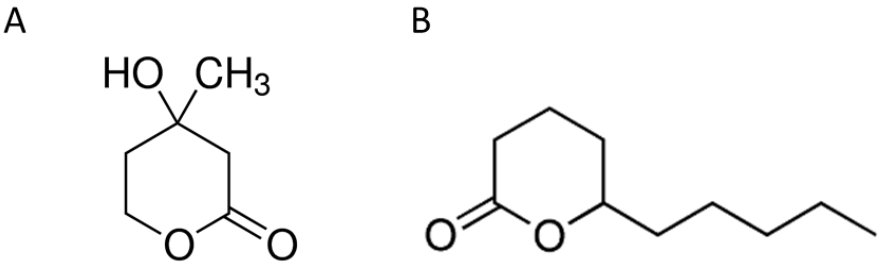


Figure 20 : Représentation schématique de la mévalonolactone (A) et de la δ - dodécalactone (B)

En 2016, une étude indienne a montré la présence de 6-deoxy-D-manno-4-lactone dans une fraction active du surnageant en milieu MRS de la souche *L. plantarum* MYS6 **(Deepthi *et al.*, 2016)**. Cette fraction contenait également un mélange d'acides gras dont l'acide 10-octadécanoique, l'acide dodécanoïque ou encore l'acide hexadécanoïque. Cependant, le lien entre la présence de ces molécules et l'activité de la fraction de ce surnageant n'est pas établi.

4. Mécanismes d'action

Les composés antifongiques produits par les bactéries lactiques agissent sur différents processus cellulaires selon leur nature (Figure 21). Comme vu précédemment, les petits acides organiques peuvent diffuser et acidifier le cytoplasme. Ils ont aussi d'autres actions comme l'inhibition de la microautophagie (acide benzoïque), ou le détournement de l'énergie cellulaire (acide acétique) (II-C-1).

De par leur partie hydrophobe, les acides gras peuvent interagir avec la membrane cellulaire. Leur mode d'action est peu connu. Cependant, une étude s'est penchée sur le mode d'action de l'acide *cis*-9-heptadécènoïque produit par la moisissures *Pseudozyma flocculosa* et actif contre des moisissures pathogènes de plantes **(Avis and Belanger, 2001)**. Cette étude a montré que les acides gras peuvent s'intégrer dans les membranes cellulaires. Cette intégration sépare les bicouches lipidiques entrainant une perte de leur intégrité. De plus, cette intégration perturbe la fluidité membranaire, altérant ainsi la perméabilité de la membrane. Ce phénomène entraîne la libération incontrôlée d'électrolytes et de protéines intracellulaires, aboutissant finalement à la désintégration cytoplasmique **(Avis and Belanger, 2001)**. Les insaturations présentent dans certains acides gras entrainent un encombrement stérique plus important puisqu'ils occupent une plus grande section transversale dans la membrane **(Avis and Belanger, 2001)**. Leur activité antifongique est donc potentiellement plus importante. En ce qui concerne les acides gras hydroxylés, Sjogren propose également que leur incorporation dans les membranes augmente leur perméabilité induisant la libération d'électrolytes et de protéines intracellulaires **(Sjogren *et al.,* 2003)**.

D'autres hypothèses ont été émises expliquant l'activité antifongique de molécules comme la perte de l'intégrité membranaire due à l'action de peptides, l'inhibition d'enzymes du métabolisme par des acides hydroxylés ou l'action d'un stress oxydatif (Figure 21) **(Siedler *et al.,* 2019)**.

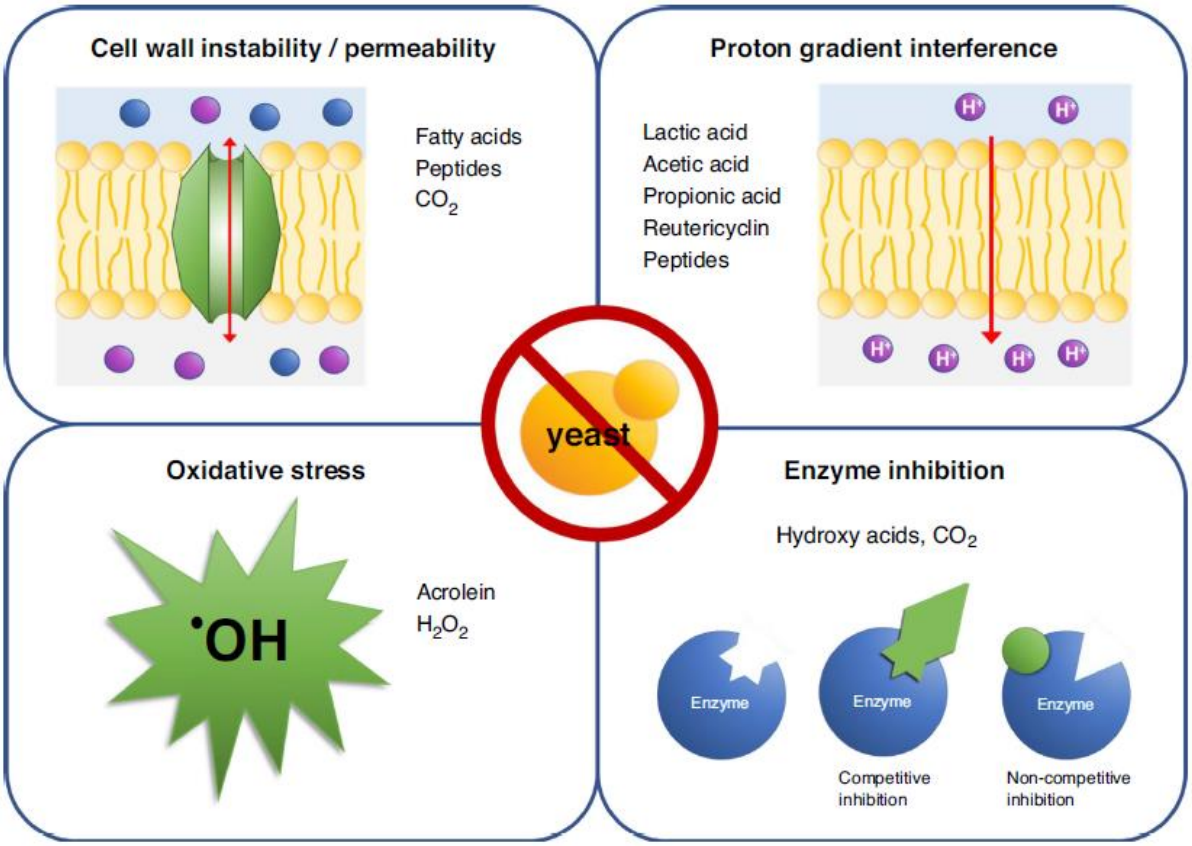


Figure 21 : Mécanismes d'action des composés produits pas les bactéries lactiques contre les levures (Siedler *et al.,* 2019).

5. Mécanismes de résistance des levures

Les principaux composés antifongiques produits par les bactéries lactiques sont des acides organiques. Parmi eux, les acides lactique et acétique sont majoritairement produits et décrits pour agir en synergie avec d'autres métabolites. Ces acides peuvent aussi être des substances ajoutées délibérément dans les produits alimentaires comme conservateurs. Cependant, l'apparition de résistances aux acides organiques chez certaines levures, notamment *S. cerevisiae* et *Zygosaccharomyces bailii,* a été décrite, rendant leur exposition aux molécules produites par les lactobacilles inefficace dans les matrices laitières **(Palma *et al.,* 2018; Piper *et al.,* 2001; Piper, 2011)**.

Plusieurs études ont cherché à comprendre les mécanismes de résistance mis en place par ces deux genres de levures, notamment contre l'acide acétique. Pour rappel, lorsque le pH du milieu est inférieur au pKa de l'acide acétique, cet acide est sous forme protonée et diffuse à travers les membranes cellulaires pour

ensuite se dissocier dans le cytoplasme. Cette dissociation entraine la libération d'un proton, acidifiant ainsi le cytoplasme.

Pour contrecarrer cette libération et lorsque le pH du milieu est supérieur au pKa de l'acide acétique, *S. cerevisiae* transporte l'acide acétique à l'intérieur de son cytoplasme par la protéine membranaire Fps1 (Figure 22) **(Mollapour and Piper, 2007)**. La présence d'acétate dans le cytoplasme active le facteur de transcription Haa1 **(Mira *et al.,* 2009)**. Ce facteur de transcription active à son tour l'expression d'autres gènes qui codent notamment pour une protéine kinase, HRK1, qui active la pompe à efflux de protons membranaire Pma1 (PM-H^+-ATPase) et d'autres gènes impliqués dans la résistance aux acides comme les exporteurs d'acétate Tpo3, Tpo2 et Aqr1 **(Mira *et al.*, 2009)**. Ainsi, l'acétate et les protons libérés sont expulsés des cellules. D'autres mécanismes découlent de l'activation de facteurs de stress comme la réduction du transport d'acide acétique par l'inactivation du transporteur Fps1 ou des changements dans la membrane cellulaire pour empêcher sa diffusion passive **(Mira *et al.,* 2009)**. De plus, les protons cytoplasmiques seraient pompés dans des vacuoles suite à l'activation de la V-H^+-ATPase (Figure 22) **(Mira *et al.,* 2010)**.

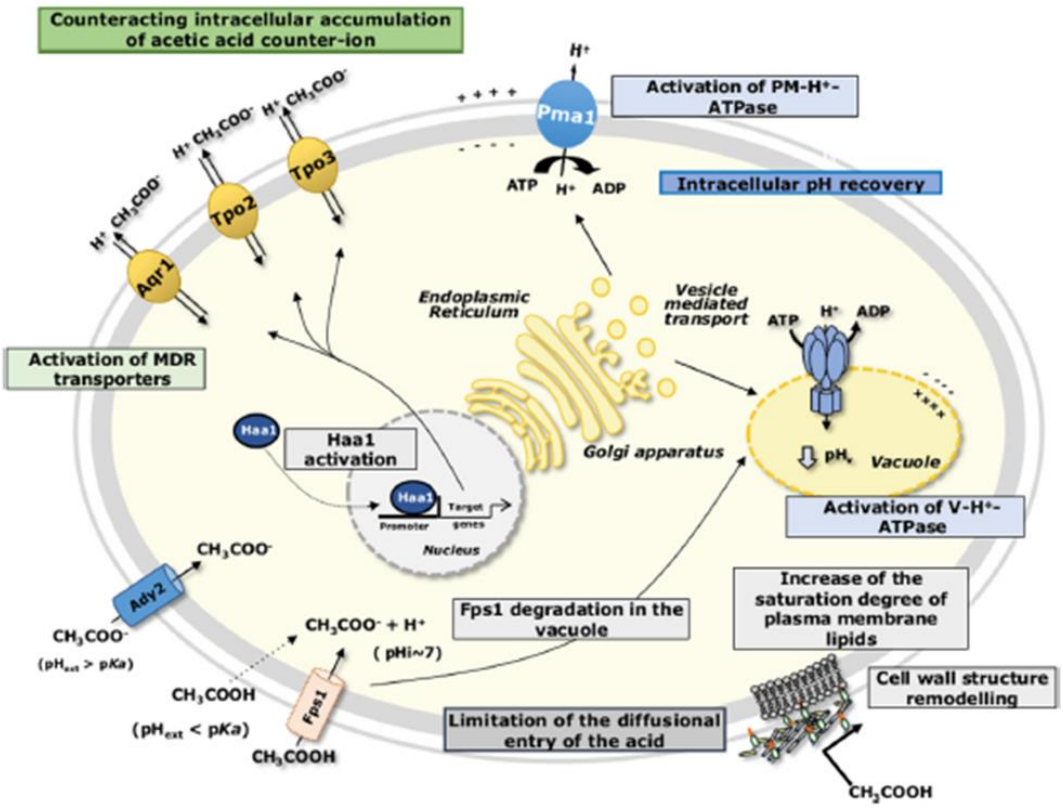


Figure 22 : Modèle schématique de la réponse adaptative au stress acide chez la levure *S. cerevisiae* induit par l'acide acétique **(Palma *et al.* 2018)**.

Un mécanisme similaire est présent chez la levure *Zygosaccharomyces bailii* (Figure 23). Celle-ci est plus résistante aux petits acides avec une CMI à pH 4 de 28 g/L pour l'acide acétique contre 8,7 g/L pour *S. cerevisiae* **(Stratford *et al.*, 2013)**. Cette espèce possède un facteur de transcription similaire à Haa1 de *S. cerevisiae*, le facteur ZbHaa1, ainsi que la pompe à efflux de protons Pma1 **(Palma *et al.*, 2018, 2017, 2015)**. A la différence de *S. cerevisiae*, l'acétate présent dans les cellules après dissociation n'est pas expulsé mais transformé en acétyl-CoA via la ZbAcs2 **(Rodrigues *et al.*, 2004)**. Cet acétyl-CoA rejoint par la suite le cycle de Krebs pour la production d'énergie **(Palma *et al.*, 2018)**.

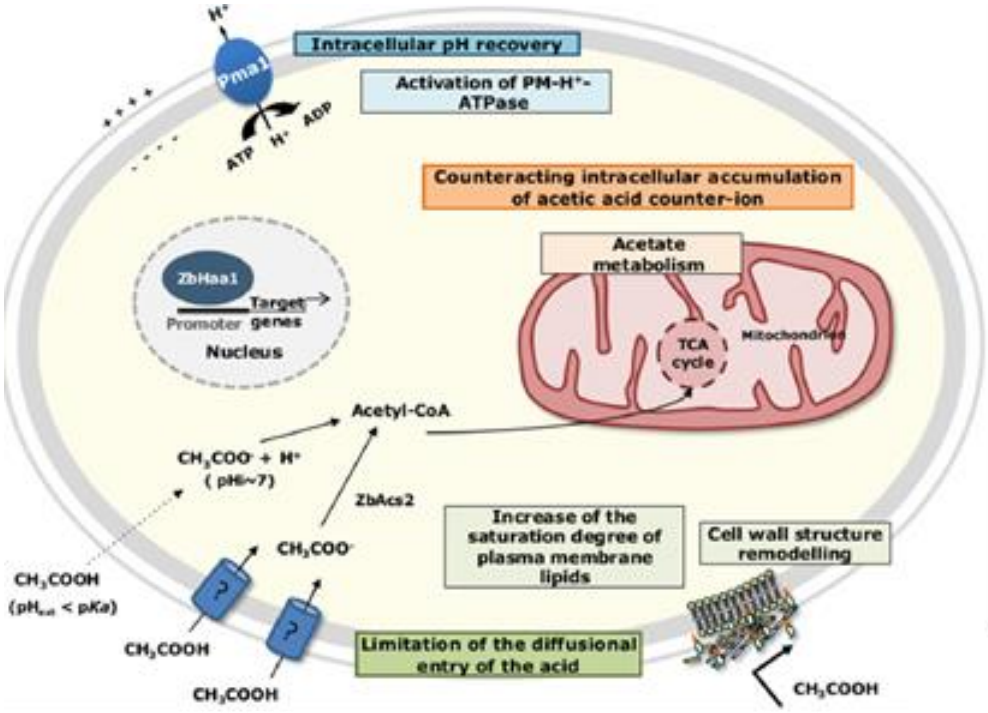


Figure 23 : Modèle schématique de la réponse adaptative au stress acide chez la levure *Zygosaccharomyces bailii* induit par l'acide acétique **(Palma *et al.* 2018)**.

Les mécanismes de résistance vis-à-vis de l'acide acétique sont aussi mis en place pour d'autres acides chez *S. cerevisiae*. L'activité de PM-H^+-ATPase est augmentée en réponse à l'acide octanoïque **(Viegas and Sa Correia, 1991)**, à l'acide sorbique **(Holyoak *et al.*, 1999)**, à l'acide décanoïque **(Alexandre *et al.*, 1996)**, à l'acide succinique **(Carmelo *et al.*, 1997)**. Le facteur de transcription Haa1 est également nécessaire pour la tolérance aux acides formique, lactique et propionique **(Abbott *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2005; Henriques *et al.*, 2017)**. Le transporteur membranaire Pdr12 permet également l'expulsion des formes dissociées propionate, sorbate et benzoate, conférant ainsi une résistance à ces acides à *S. cerevisiae* **(Hatzixanthis *et al.*, 2003; Holyoak *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1998; Piper, 2011)**.

D. Méthodologie de caractérisation des molécules antifongiques des LAB

1. Schéma général

Les méthodologies mises en application afin de purifier et d'identifier les molécules antimicrobiennes produites par les LAB suivent pour la plupart le même cheminement (Figure 24). Après identification de souches possédant une activité, celles-ci sont cultivées en milieu synthétique le plus souvent dans des conditions de croissance optimales. Les surnageants de culture sont par la suite stérilisés par filtration et soumis à différents traitements pour identifier la nature des molécules impliquées dans l'activité. La purification des molécules antifongique est le plus souvent guidée par le suivi de l'activité antifongique à chaque étape (ou dans chaque fraction). Les molécules antifongiques contenues dans les surnageants sont d'abord extraites. Les deux méthodes les plus fréquemment utilisées sont l'extraction en phase solide (SPE) ou l'extraction liquide-liquide. Les molécules présentes dans les fractions ainsi obtenues sont ensuite séparées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou par chromatographie en phase gazeuse (GC). Les molécules antifongiques contenues dans les fractions actives contre les souches fongiques sont par la suite identifiées en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS), ou en phase gazeuse (GC-MS) ou par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).

Pour tester le rôle d'acides organiques dans l'activité antifongique, le pH des surnageants est augmenté (ou neutralisé) par ajout d'une solution de base, telle que la soude, afin de les passer de formes protonées à dissociées et réduire l'activité antifongique **(Arena *et al.,* 2016; Atanassova *et al.,* 2003; Gerez *et al.,* 2013; Ndagano *et al.,* 2011; Sharma and Srivastava, 2014)**. La présence de molécules de nature peptidique est, quant à elle, testée par digestion à l'aide de protéases à spectre large telles que la protéinase K, la trypsine, l'α-chymotrypsine, la pronase E ou encore la papaïne **(Arena *et al.,* 2016; Atanassova *et al.,* 2003; Gerez *et al.*, 2013; Ndagano *et al.,* 2011; Sharma and Srivastava, 2014)**. Un traitement thermique peut être également réalisé afin de déterminer si les molécules impliquées sont thermorésistantes (comme les acides organiques ou les peptides) ou non

(comme les protéines) **(Arena *et al.*, 2016; Atanassova *et al.*, 2003; Gerez *et al.*, 2013; Sharma and Srivastava, 2014)**.

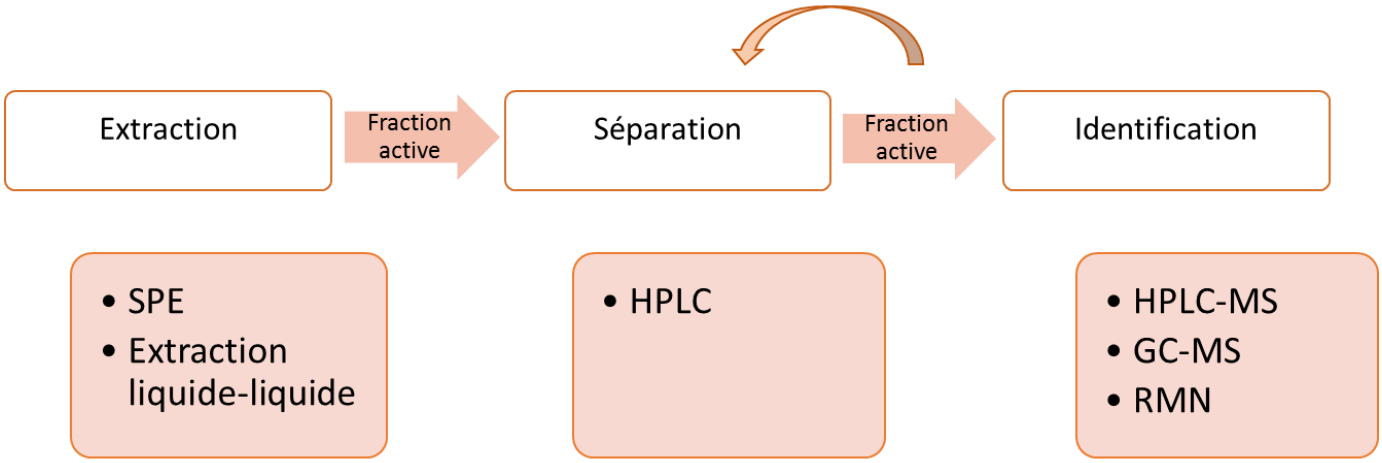


Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de purification des molécules actives contenues dans le surnageant de culture des LAB.
Extraction suivie d'une séparation des molécules par HPLC (répétée si nécessaire) puis identification par spectrométrie de masse ou RMN (Adapté de Crowley *et al.,* 2013).

2. Analyse des acides organiques majoritaires

Les acides organiques majoritaires, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou encore propionique peuvent être identifiés et dosés par HPLC après séparation sur colonne à exclusion d'ions **(Andersson and Hedlund, 1983; Crowley *et al.*, 2013; Gerez *et al.*, 2013; Kulozik and Wilde, 1999; Ndagano *et al.*, 2011; Quattrini *et al.*, 2018; Schwenninger and Meile, 2004).** Cette approche est relativement efficace et ne nécessite aucun traitement au préalable du surnageant (sauf dilution si nécessaire).

3. Identification des molécules antifongique

L'identification de molécules antifongiques produites plus minoritairement dans le surnageant des LAB nécessite que celles-ci soient purifiées et concentrées. Le premier critère de fractionnement de molécules réside dans leur polarité et donc, la séparation des composés polaires et des composés apolaires.

a. Extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide de molécules actives est la plus souvent réalisée sur résine C18 **(Broberg *et al.,* 2007; Sjogren *et al.,* 2003; Ström *et al.,* 2002; Yang *et al.,* 2011)**. Cette approche est relativement peu spécifique puisqu'elle permet d'extraire des composés peu polaires à apolaire par passage comme des acides organiques, des dipeptides cycliques, des lactones, etc.

En 2002, une équipe suédoise a décrit un protocole expérimental appliqué sur le surnageant de la souche *L. plantarum* MiLAB 393 nécessitant une étape d'extraction des molécules du surnageant par SPE (Solide Phase Extraction) sur résine C18 suivie d'un fractionnement par HPLC en phase inverse sur colonne C18 **(Ström *et al.,* 2002)**. Les 64 fractions obtenues ont été testées sur la croissance d'*A. fumigatus*. Deux de ces fractions se sont révélées actives et ont permis d'isoler les différentes molécules présentes après une deuxième HPLC sur une colonne de carbone graphite poreux. Ces fractions contenaient l'acide phényllactique ainsi que deux peptides cycliques après analyse en spectroscopie RMN.

La même approche d'extraction par SPE suivi d'une HPLC en phase inverse a également été réalisée sur le surnageant de la souche *L. plantarum* MiLAB 14 **(Sjogren *et al.,* 2003)**. L'extraction suivie d'une méthylation pour l'analyse en GC-MS s'est révélée applicable pour les souches *L. plantarum* MiLAB14 et MiLAB393, cultivées dans un ensilage d'herbe permettant la détection de plusieurs molécules antifongique : les acides 3-hydroxydecanoïque, 2-hydroxy-4-methylpentanoïque, benzoïque, l'acide hydrocinnamique, l'acide salicylique, l'acide 3-phenyllactique, 4-hydroxybenzoique, 3,4- dihydroxycyclohexane-1-carboxylique, p-hydrocoumarique, vanillique, azelaïque, hydroférulique, p-coumarique, hydrocaffeïque, férulique, cafeïque et le catechol **(Broberg *et al.,* 2007)**.

La combinaison SPE-HPLC a aussi permis de mettre en évidence une fraction active contre *A. fumigatus* à partir du surnageant de la souche *L. plantarum* AF1 **(Yang *et al.,* 2011)**. L'analyse par GC-MS a permis de révéler la présence d' δ-dodecalactone dans cette fraction.

La présence d'acide gras a également été montrée par couplage SPE-HPLC. En 2014, Ryu et son équipe ont montré par cette approche la présence d'acides gras actifs tels que l'acide 5-oxododecanoïque, l'acide 3-hydroxydécanoïque et l'acide 3-hydroxy-5-dodécénoïque **(Ryu *et al.*, 2014)**.

b. Extraction liquide-liquide

b.1 Analyse d'acides organiques : acétate d'éthyle

Le fractionnement de surnageant de culture par extraction liquide-liquide est le plus utilisé à l'heure actuelle. Lavermicocca et son équipe ont décrit, en 2000, l'une des premières procédures d'extraction de composés antifongiques dans le surnageant de culture de LAB basée sur l'utilisation successive de solvants de polarité croissante tels que l'hexane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol. Comme pour les approches d'extraction en phase solide, l'activité des extraits avait été suivie et la plus forte activité contre *Endomyces fibuliger* était retrouvée dans la fraction acétate d'éthyle. L'analyse par GC-MS de cette fraction a permis de mettre en évidence la présence d'acide phényllactique, d'acide 4-hydrophényllactique, d'acide palmitique, d'acide oléique et d'acide stéarique.

Ces procédures se sont par la suite généralisées et le choix du solvant d'extraction est primordial pour les molécules recherchées. L'acétate d'éthyle est le solvant le plus couramment utilisé **(Axel *et al.*, 2016, 2014; Brosnan *et al.*, 2014, 2012; Lavermicocca *et al.*, 2003, 2000; Ndagano *et al.*, 2011; Poornachandra Rao *et al.*, 2017)**. Il permet l'extraction de nombreux composés, de polarité intermédiaire à apolaire, comme certains acides organiques possédant un noyau phényle, les acides gras ou encore les dipeptides cycliques.

En 2012, Brosnan et son équipe ont décrit un protocole d'extraction des molécules antifongiques contenues dans le surnageant de LAB en milieu MRS par acétate d'éthyle, suivi d'une analyse par LC-MS. Lors de l'analyse par LC-MS, ce protocole décrit la recherche et l'identification de 25 composés antifongiques connus par leur temps de rétention et du spectre de masse associé. Ces molécules sont principalement des acides organiques possédant un noyau phényl tels que les

acides phényllactique, hydroxyphényllactique, benzoïque, hydroxybenzoïque, vanillique, férulique, etc.

En 2014, cette même équipe a proposé une amélioration de s premier protocole, permettant une extraction plus rapide et plus reproductible de molécules antifongiques présentes dans des surnageants de culture en MRS : l'approche QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe) (Brosnan *et al.,* 2014). Cette méthode couple une approche d'extraction en phase liquide-liquide suivie par un lavage de la phase organique obtenue par SPE. Ainsi, un mélange de surnageant de LAB en milieu MRS et d'acétate d'éthyle (v/v) est réalisé, l'ajout de $MgSO_4$ et de NaCl permet une meilleure séparation. La phase organique est par la suite lavée pour éliminer les résidus par SPE sur résine C18, concentrée par évaporation du solvant, puis analysée par LC-MS. Le protocole décrit permet d'identifier 15 molécules antifongiques possédant un noyau phényl mais également de les doser. Cette approche a été par la suite utilisée dans d'autres études afin de mieux caractériser des activités antifongiques dans divers milieux tels que le MRS **(Guimarães *et al.,* 2018; Lipińska *et al.,* 2018; Yépez *et al.,* 2017)**, le levain **(Axel *et al.,* 2016; Belz *et al.,* 2019; Le Lay *et al.,* 2016)** ou encore des matrices laitières **(Leyva Salas, 2018; Luz *et al.,* 2018)**.

b.2 Analyse d'acide gras : chloroforme ou hexane

L'acétate d'éthyle permet l'analyse de composés divers de polarité intermédiaire ou apolaire. Lors de l'analyse d'acide gras, le choix d'un solvant plus apolaire, comme le chloroforme sera privilégié, en association avec du méthanol pour stabiliser la réaction **(Black *et al.,* 2013a; Ndagano *et al.,* 2011)**.

En 2011, cette approche a permis de mettre en évidence la présence d'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque dans le surnageant des souches *L. plantarum* VE56 et *Weissella paramesentoroides* LC11 cultivées en milieu MRS **(Ndagano *et al.,* 2011).** L'extraction au chloroforme/méthanol a également permis de montrer la présence d'acide 10-hydroxy-12-octadécènoïque dans le surnageant de la souche *L. hammesii* DSM16381 **(Black *et al.,* 2013a)**.

Des extractions d'acides gras par un mélange de solvants contenant de l'ether/heptane (1:1) ont également été réalisées sur des matrices laitières (yaourts, fromages, crème fraiche) **(Leyva salas 2018)**. Ceci a permis d'identifier de nombreux acides gras au sein de ces matrices tels que les acides octadécanoïque et 9Z-octadécénoïque dans un modèle de fromage et les acides décanoïque, dodécanoïque et hexadécanoïque dans un modèle de yaourt **(Leyva salas 2018)**.

b.3 Extraction des composés volatiles ou semi-volatiles

L'analyse des composés antifongiques volatiles ou semi-volatiles produits par les LAB n'est que peu décrite et ne fait donc pas partie du schéma général de recherche de molécules actives (Figure 24). En 2015, Aunsbjerg a démontré l'action de composés volatiles contre la croissance de Penicillium qu'il a associé à la présence de diacétyle, en matrice laitière. Celui-ci a été détecté et dosé par analyse de sorption dans l'espace de tête ou head space sorptive extraction (HSSE) suivie d'une analyse GC-MS. Dans une autre étude, l'analyse des molécules antifongiques volatiles ou semi volatiles présentes dans des yaourts, fromages ou crème fraiche inoculés avec des ferments de biopréservation, a été réalisée par approche headspace-trap suivie d'une séparation et identification par GC-MS **(Leyva Salas, 2018)**. Cette étude a montré l'augmentation de molécules antifongiques comme le diacétyle, l'acide acétique, le 2-nonanone et d'un autre composé volatile actuellement non identifié (VX) dans les produits laitiers testés contenant des souches protectrices. Cependant, le lien entre leur présence et l'activité reste à déterminer.

III – Matériels et méthodes

A. Souches microbiennes et milieux de culture

1. Souches de LAB étudiées et conditions de culture

Dans cette étude, l'activité antifongique de dix-huit souches de lactobacilles issues de la collection de l'entreprise BIOPROX a été étudiée. Celles-ci, répertoriées dans le tableau 4, sont de diverses origines telles que des produits laitiers, des végétaux, humaine, etc. Ces souches ont été conservées à -80°C dans 20% de glycérol.

Tableau 4 : Souches de lactobacilles étudiées et leur origine

Espèces	N° souche	Source
Lactobacillus rhamnosus	5326	Humain
Lactobacillus rhamnosus	5718	Humain
Lactobacillus rhamnosus	6311	Inconnue
Lactobacillus plantarum	5329	Végétaux
Lactobacillus plantarum	5711	Produit laitier
Lactobacillus plantarum	1096	Végétaux
Lactobacillus plantarum	6402	Inconnue
Lactobacillus pentosus/plantarum	6660	Végétaux
Lactobacillus casei	7006	Produit laitier
Lactobacillus casei	6960	Produit laitier
Lactobacillus casei	6575	Inconnue
Lactobacillus casei/paracasei	6630	Inconnue
Lactobacillus casei/paracasei	5661	Végétaux
Lactobacillus paracasei	6363	Humain
Lactobacillus sp.	6795	Inconnue
Lactobacillus sp.	6796	Inconnue
Lactobacillus spicheri	6187	Végétaux
Lactobacillus zymae	6188	Végétaux

Les souches de lactobacilles ont été cultivées en milieu MRS. Ce milieu est composé initialement de : peptone 10 g/L, extrait de viande 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, citrate d'ammonium 2 g/L, acétate de sodium 5 g/L, sulfate de magnésium 0,1 g/L, sulfate de manganèse 0,05 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L et de glucose 20 g/L. Le repiquage des souches à partir du stock à -80°C, les dénombrements d'UFC, les tests de criblage de souches à activité antifongique et les tests sur la nature des molécules actives ont été réalisés à partir de MRS commercial (BD Difco, USA) liquide ou gélosé à 15 g/L d'agar. Lors du dénombrement à partir des laits fermentés en challenge test, le MRS a été acidifié à pH 5,4 avec de l'acide acétique (MRSa) afin d'inhiber la prolifération des souches contenues dans le ferment d'acidification. Les dénombrements des souches de biopréservation ont ainsi été réalisés en MRSa gélosé à 15g/L par ensemencement dans la masse.

Afin de tester l'influence de la source de carbone et de l'acétate de sodium, un milieu MRS « fait maison » a été réalisé avec la même composition de base que le MRS commercial (ci-après désigné par l'acronyme MRS), il sera désigné comme MRS-Glc. Par ailleurs, à partir du même mélange de départ, le glucose à 20 g/L a été remplacé par du lactose à 18,8 g/L (MRS-Lac), ou l'acétate de sodium a été omis (MRS-sAc). L'influence d'acides animés comme précurseurs de molécules antifongiques a été analysée par ajout en milieu MRS-Glc de leucine à 2 et 20 g/L ou de phénylalanine à 2 et 20 g/L.

Les souches de lactobacilles ont également été cultivées en milieu lait (100 g/L de poudre de lait écrémé et lyophilisé, fournie par BIOPROX) liquide ou gélosé à 15 g/L. Ce lait a été stérilisé à 110°C pendant 30 minutes pour utilisation en monoculture de lactobacilles. Afin de tester l'influence de la phénylalanine sur la production de molécules antifongiques, un ajout de 2 g/L a également été réalisé. Lors de la réalisation de laits fermentés, ce lait a été pasteurisé à 84°C pendant 40 minutes pour se rapprocher de conditions industrielles.

Lors de la réalisation de challenge tests en laits fermentés, l'ajout d'un ferment d'acidification a été réalisé. Celui-ci est constitué d'un mélange de deux souches : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (DI-PROX M 270, BIOPROX, France).

2. Souches de moisissures étudiées

L'activité antifongique des différentes LAB présentées plus haut (III-A-1) a été testée contre diverses moisissures, isolées de contaminations de produits laitiers. Ces souches sont listées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des différentes souches de moisissures utilisées

Genre /espèce	**N° souche**
Mucor sp.	3652
Penicillium crustosum	3673
Penicillium chrysogenum	3674
Penicillium roqueforti	3675
Aspergillus niger	4624

Les moisissures ont été cultivées pendant deux semaines à 25°C sur un milieu gélosé « potato dextrose agar » (PDA) (70139, Merck, USA) composé d'extrait de pomme de terre 4 g/L, de glucose à 20g/L et d'agar à15 g/L. Les spores obtenues ont été récoltées avec 10 mL d'eau physiologique stérile contenant 0,01 % de Tween-80. Elles ont été conservées à -80°C dans de l'eau physiologique contenant 0,01 % de Tween-80 et 20% de glycérol.

3. Souches de levures étudiées

L'activité antifongique des différentes LAB a également été testée contre diverses levures, isolées de contaminations de produits laitiers. Ces souches sont listées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Liste des différentes souches de levures utilisées

Genre /espèce	**N° souche**
Saccharomyces boulardii	3667
Candida lusitaniae	3668
Candida intermedia	3669
Rhodotorula mucilaginosa	3671

Les levures ont été cultivées dans deux milieux, gélosés ou non à 15 g/L d'agar : le milieu YPD (10 g/L yeast extract ; 20 g/L tryptone ; 20 g/L glucose) pour *R. mucilaginosa* 3671 et *Saccharomyces boulardii* 3667 ou le milieu YM (3 g/L yeast extract; 3 g/L malt extract; 5 g/L tryptone; 10 g/L glucose) pour les deux souches de *Candida*. Lors du criblage antifongique en double couche, le taux d'agar a été abaissé à 6 g/L (gélose molle). Concernant les tests d'activité des surnageants de culture des lactobacilles, les levures ont été cultivées en milieu YNB (BD Difco, USA) avec ajout de glucose à 5 g/L. Enfin, le dénombrement de *C. lusitaniae* 3668 a été réalisé sur gélose Sabouraud glucose agar (SGC) (89579, Sigma-aldrich, USA). Ce milieu contient du chloramphénicol à 150 µg/mL, inhibant ainsi la croissance des ferments d'acidification et de biopréservation.

B. Criblage de l'activité antifongique des souches de LAB

1. Activité anti-moisissures

L'activité anti-moisissures des diverses souches de lactobacilles a été testée en milieu lait. Pour cela, une colonie de lactobacille issue d'un milieu gélosé MRS est prélevée et inoculée dans 13 mL de milieu MRS liquide. Après une incubation de 48 h à 30°C, 50 µL de cette culture sont déposés au centre d'une boite de Pétri de 90 mm. Un volume de 25 mL de lait gélosé est ajouté puis, après homogénéisation, les boites sont incubées à 30°C pendant 24h. Une suspension fraîche de spores est ajustée à 2.10^4 spores/mL après numération au microscope sur lame Fast-Read 102® (BIOSIGMA, Italy). Un volume de 5 µL (~ 100 spores) est déposé à la surface des géloses et l'ensemble est incubé à 25°C pendant sept jours.

2. Activité anti-levures

La croissance des levures étant difficile à visualiser sur un milieu à base de lait, l'activité anti-levures a été testée sur milieu MRS gélosé. Dans un premier temps, à partir d'une colonie, les souches de lactobacilles sont striées sur géloses MRS, puis cultivées 24 à 48 h à 37°C. Suite à cette incubation, 6 mL de gélose molle YPD ou YM, inoculée à 1% à partir d'une culture fraîche de levures (DO_{600nm} = 0,06) sont coulés à la surface des boites **(Arena *et al.*, 2016)**. Celles-ci sont incubées à

température ambiante jusqu'à une croissance manifeste des levures dans la gélose molle, soit 24 à 48h.

C. Caractérisation de l'activité antifongique

1. Préparation des surnageants de cultures

A partir d'une colonie de lactobacilles, 13 mL de milieu MRS, MRS-Glc, MRS-Lac, MRS-sAc et lait (supplémentés ou non en acides aminés) ont été inoculés, puis incubés à 30°C pendant 24h. Après contrôle de la croissance par lecture de la DO_{600nm} en milieux MRS, un volume de 500 µL de chaque préculture a été inoculé dans 50 mL du même milieu. Ce nouvel ensemencement est incubé à 30°C pendant 24h. La culture est centrifugée à 8 000g pendant 8 minutes puis le surnageant est stérilisé par filtration (0,2 µm).

2. Test d'activité des différents surnageants de culture

a. Test qualitatif

La souche *C. intermedia* 3669 est l'espèce fongique la plus sensible sur boite (Partie IV-A). Afin de confirmer l'activité des lactobacilles en milieu liquide, 100µL du surnageant stérilisé sont ajoutés à 100µL d'une suspension de levures (DO_{600nm} = 0,06) en milieu YNB dans les puits d'une microplaque 96 puits. Cette microplaque est incubée à 25°C sous agitation à 180 rpm pendant 24h. La croissance de *C. intermedia* 3669 est par la suite estimée par lecture d'absorbance à DO_{600nm}. La souche de *C. intermedia* 3669 formant des biofilms au fond des puits, ces premiers essais n'ont permis que d'avoir une réponse qualitative (activité 100% ou non).

b. Test quantitatif

Afin de quantifier plus finement la croissance de *C. intermedia* 3669 en présence des différents surnageants, une suspension de *C. intermedia* 3669 est réalisée dans 5 mL de milieu YNB à partir d'une colonie sur boite. Après une incubation 24h à 25°C sous 180 rpm d'agitation, les cellules sont dénombrées au microscope à l'aide d'une lame de numération (Fast-Read 102). A partir de cette

culture, une nouvelle suspension en YNB contenant 5 log_{10} cellules/mL est réalisée puis 100 µL sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits. 100 µL des surnageants issus des différentes cultures de lactobacilles sont ajoutés aux 100 µL de levures. La plaque 96 puits est incubée 24h à 25°C sous 180 rpm.

Le contenu de chaque puits est homogénéisé par aspiration/refoulement. 20 µL des cultures de *C. intermedia* 3669 sont ajoutés à 180µL de PBS dans une nouvelle plaque 96 puits puis dilués au dixième en série jusqu'à la dilution 10^{-4}. 10 µL de chacune de ces dilutions sont déposés sur gélose SGC incubée à 25°C. Après 24h, le nombre d'UFC de levures est déterminé.

3. Activité en challenge test

Les six souches de lactobacilles testées, possédant le spectre d'activité antifongique le plus large contre les levures lors du criblage à savoir : *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 et les souches ne présentant aucune activité sur boite, sélectionnées comme contrôle négatif : *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 ont été lyophilisées par BIOPROX.

Une préculture de chaque souche a été réalisée dans un milieu contenant du glucose à 20 g/L, de l'extrait de levure liquide à 50 g/L, du sorbitol monooléate à 1 g/L, du $MgSO_4$ à1 g/L, du $MnSO_4$ à 0.5 g/L, du K_2HPO_4 à 2 g/L et de l'acétate de sodium à 5 g/L et incubée à 37°C pendant 16h. 1% (v/v) de cette préculture est ensuite inoculé dans 1L du même milieu dépourvu de K_2HPO_4 et d'acétate de sodium. La culture est incubée à 35°C pendant 17h sous agitation à 300 rpm. Afin de maintenir le pH à 5,7 (permettant d'obtenir le meilleur rendement en termes de biomasse), la culture est supplémentée tout au long du processus en NH4OH, lorsque nécessaire. Les cultures sont par la suite supplémentées en cryoprotectant puis lyophilisées (procédé confidentiel). Les concentrations des lyophilisats sont dénombrées par comptage des UFC sur gélose MRS. Les lyophilisats sont stockés à -20°C.

Pour la préparation de lait fermenté, 1L de lait pasteurisé est inoculé selon les recommandations du fournisseur avec 30 mg de ferment d'acidification (DI-PROX M 270, BIOPROX, France), contenant une souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis* et une de *Lactococcus lactis cremoris*. Cet ajout permet

d'assurer une diminution rapide du pH jusqu'à 4,5 en fin de fermentation. Après homogénéisation, le lait pasteurisé est réparti dans 10 flacons de 100 mL. Chacun de ces falcons est inoculé avec environ 7 log_{10}UFC/mL.de la souche de lactobacilles à tester Les laits fermentés sont incubés à 22°C au bain marie pendant 18h (étape de fermentation).

La souche *C. lusitaniae* 3668 s'est révélé la souche de levure contaminante la plus résistante lors du criblage sur boite de l'activité antifongique (IV-A). Ainsi pour sélectionner, parmi les souches actives, le meilleur candidat pour une application industrielle, cette cible apparait comme la plus pertinente. Ainsi, une contamination des laits fermentés a été réalisée, après l'étape de fermentation (18h), par inoculation de 15 UFC/mL de *C. lusitaniae* 3668. Après homogénéisation du produit, les laits fermentés sont répartis en trois fois 2,5 mL dans une microplaque de 24 puits. Ces plaques sont scellées au moyen de parafilm puis incubées à 7°C pendant 21 jours.

Le développement de la souche *C. lusitaniae* 3668 est déterminé par un dénombrement, après 14 et 21 jours de stockage, sur boites SCG (incubées à 25°C pendant 48h).

D. Caractérisation des molécules actives

1. Nature des molécules actives

Un ensemble de tests simples, couramment utilisés, ont été appliqués afin de déterminer la nature des molécules actives **(Arena *et al.,* 2016; Magnusson and Schnürer, 2001; Sharma and Srivastava, 2014)**. Ainsi, à partir des surnageants de culture obtenus en milieu MRS, l'effet de protéases (digestion par ajout de 100 µg/mL de trypsine ou de protéinase K), la dénaturation thermique (120°C pendant 15 minutes) et l'augmentation du pH à 5, 6 et 7 (par ajout de NaOH à 10 M) sur les molécules antifongiques présentes a été testé. L'activité des surnageants ainsi traités a été testée en milieu liquide comme décrit en III-C-2-a.

2. Fractionnement des molécules du surnageant par SPE

Afin de séparer les composés des surnageants des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 selon leur polarité, une extraction en phase solide (SPE) a été réalisée sur une cartouche Sep-Pak C18 (360 mg, 55-105 µm, Waters) comme décrit par Ström et collaborateurs en 2002, avec quelques modifications. Le pH du surnageant de culture en milieu MRS est ajusté à 2 par ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) et 20 mL sont ensuite passés sur la cartouche Sep-Pak. La colonne est lavée avec 5 mL d'eau ultra pure puis éluée par passages successifs de 5 mL de solutions eau-acétonitrile (ACN) 10, 20, 40, 60, 80 et 100%. Les fractions contenant de l'ACN sont, par la suite, évaporées à sec par lyophilisation puis les extraits secs sont re-suspendus dans 500 µL de tampon citrate 25 mM à pH 3,8. Pour identifier les fractions contenant des molécules actives, des tests d'activité contre *C. intermedia* 3669 en milieu liquide YM ont été réalisés comme décrit au paragraphe III-C-2-a.

3. Dosage des acides « majoritaires » : acides lactique et acétique

Une séparation des acides organiques présents dans chaque surnageant est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) **(Cortés-Zavaleta *et al.*, 2014)**. Ainsi, 100 µL de surnageant filtré, dilué au dixième, sont analysés par séparation sur une colonne Aminex HPX-87H à exclusion d'ions (300 mm x 7,8 mm, BioRad) à l'aide d'une phase mobile à 3,3 mM d'acide sulfurique, avec un débit de 0,6 $mL.min^{-1}$. La détection des composés est réalisée en UV à 210 nm. En parallèle, des solutions étalons ont été analysées afin de déterminer la gamme de linéarité du dosage de ces deux acides par cette méthode. Ainsi, les courbes obtenues sont linéaires pour des concentrations comprises entre 0,5 et 20 mM pour l'acide lactique et 5 et 100 mM pour l'acide acétique.

4. Dosage d'acides organiques minoritaires : Approche QuEChERS-LC-MS

a. Extraction des acides organiques par QuEcHERS

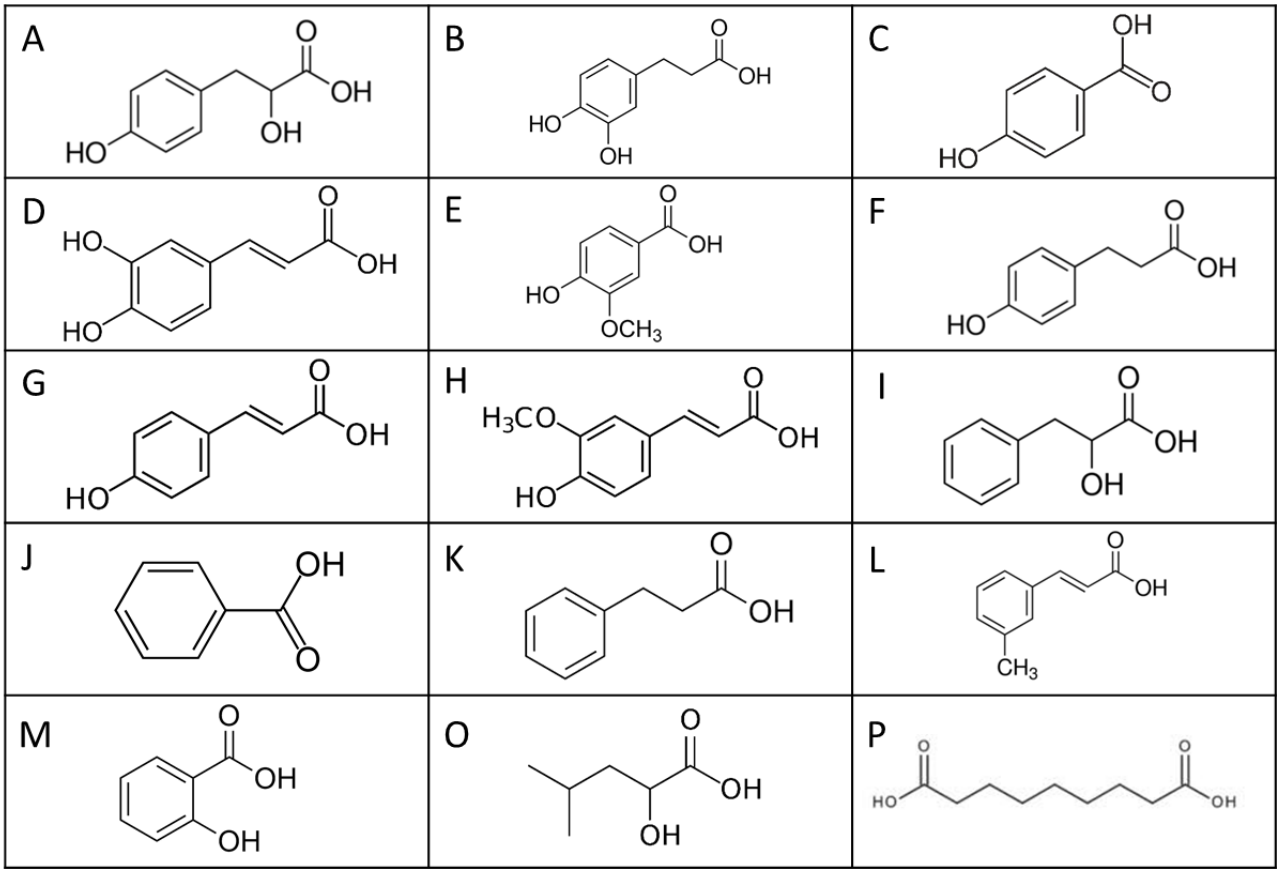
Afin d'extraire les composés d'intérêt, une extraction des acides carboxyliques par une approche QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe) a été réalisée selon la méthode décrite par Brosnan et collaborateurs (2014) avec quelques modifications. Un volume de 15 mL de surnageant est ajouté à 15 mL d'ACN contenant 0,1% d'acide formique, 6g de $MgSO_4$ et 1,5g de NaCl. Après agitation à température ambiante pendant 1 minute, ce mélange est centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. La phase organique est récupérée puis transférée dans des tubes de 15 mL QuEChERS Dispersive SPE (Cat#5982-5156, Agilent) contenant 150 mg de résine C18 et 900 mg de $MgSO_4$. Après agitation à température ambiante pendant 1 minute, ce mélange est centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Un volume de 10 mL d'extrait est ensuite concentré dans un évaporateur rotatif à 42°C. L'extrait sec est repris dans 1 mL d'eau. Afin de déterminer le rendement d'extraction des molécules d'intérêt (figure 1), le même procédé a été appliqué à du milieu dans lequel ces molécules ont été ajoutées à 10 mg/L.

b. Préparation des standards

La liste et les structures des molécules antifongiques dosées lors de cette étude sont présentées dans le tableau 7. Pour chacune, une solution stock est réalisée à 2 $g.L^{-1}$ en dissolvant 4 mg dans 2 mL d'eau ou d'ACN selon leur solubilité. Un mélange des 15 composés est réalisé en ajoutant 100 µL de chaque solution stock à 300 µL d'eau (100 µg/mL final de chaque molécule). A partir de ce standard, des étalons à 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 et 50 mg/L sont préparés puis 4 µL de chaque sont analysés en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS comme décrit en III-D-4-c.

Tableau 7 : Structure des 15 composés antifongiques recherchés par l'approche QuEChERS couplé à la LC-MS :

acide DL-p-hydroxyphénylactique (A), acide 3,4-dihydroxy-hydrocinnamique (B),acide 4-hydroxybenzoïque (C), acide caféique (D), acide vanillique (E), acide 3-(4-hydroxyphenyl) propionique (F), acide p-coumarique (G), acide férulique (H), acide phénylactique (I), acide benzoïque (J), acide hydrocinnamique (K), acide méthylcinnamique (L), acide salicylique(M), acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (N), acide azélaïque (O).



c. Analyse des extraits par LC-MS

Les différents extraits sont dilués au dixième, vingtième ainsi qu'au cinquantième afin de pouvoir détecter les molécules d'intérêt dans la gamme de linéarité préalablement établie avec les solutions de standards. 4µL de ces dilutions sont par la suite analysés en LC-MS.

La séparation des composés est réalisée sur une colonne ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 1,7 µm, 4,6 mm X 100 mm (Waters, USA) à un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$. La phase mobile est composée d'un éluant composé d'eau et de 0,2% d'acide formique (A) et d'un éluant composé d'ACN et 0,2% d'acide formique (B). Un gradient de séparation a été optimisé et comprend les étapes suivantes : 0 min –

5% (B) ; 2 min –10% (B) ; 6 min – 25% (B) ; 8 min – 30% (B) ; 10 min – 45 % (B) ; 12 min – 95% (B) ; 13 min – 95% (B) ; 15 min – 5% (B).

Les masses molaires des composés élués ont été déterminées par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS) dans un Xevo Q-TOF (Waters, USA). Les échantillons ont été analysés en mode négatif à une tension d'ionisation de 3,5 kV. La température de la source a été réglée à 120°C et la température de désolvatation à 450°C.

5. Recherche de peptides actifs

La recherche de peptides actifs a été réalisée dans les laits fermentés contenant les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 à 21 jours de stockage à 7°C. Les laits fermentés ont été centrifugés à 10 000g pendant 30 minutes et le surnageant a été filtrés sur 0,2 µm. Un ajout de 16 g de sulfate d'ammonium a été réalisé dans 30 mL de ce surnageant. Ce mélange a été agité doucement pendant 18h à 4°C. Après une centrifugation pendant 45 minutes à 4°C, le culot est repris dans 1,5 mL d'eau stérile (concentration au 20^{e}). 100 µL de cet extrait protéique a été testé contre la croissance de *C. intermedia* 3669 en plaque 96 puits comme décrit au paragraphe III-C-2b.

6. Analyse des acides gras

L'extraction des acides gras a été réalisée à partir de lait fermenté, après 14 et 21 jours de stockage à 7°C. Les laits fermentés ont été centrifugés à 10 000g pendant 30 min. Le surnageant (petit lait) a été stérilisé par filtration à 0,2 µm. Avant l'étape d'extraction, une quantité de 500 mg d'acide heptadécanoïque (C:17) a été ajouté à 30 mL du surnageant avant chaque extraction (étalon interne). Par la suite, l'extraction a été réalisée comme décrit par Ndagano et collaborateurs (2011) avec quelques modifications. Un volume de 60 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) a été ajouté à 30 mL de surnageant. Le mélange a été homogénéisé pendant 1 min puis laissé à décanter pendant 30 min. La phase organique a été récupérée, et la phase aqueuse a été de nouveau extraite de la même manière à deux reprises.

Les phases organiques ont été récoltées. Toute trace d'eau a été éliminée par ajout de $MgSO_4$ et les phases ont été évaporées à 42°C dans un évaporateur rotatif.

Les extraits secs ont été méthylés par ajout de 2 mL de méthanol/acide sulfurique (2,5%, v/v) suivi d'une incubation de 16 h à 55°C. Successivement, 1,5 mL d'eau et 1,5 mL d'hexane ont été ajoutés aux échantillons. Ceux-ci ont été homogénéisés au vortex pendant 1 min puis centrifugés à 410 *g* pendant 30 s. La phase organique a été récupérée, et la phase aqueuse à nouveau extraite par 1,5 mL d'hexane. Les phases organiques récoltées ont été regroupées puis évaporées sous flux d'azote à 80°C et les extraits secs ont été repris dans 500 µL d'hexane. Ces extraits ont ensuite été analysés en chromatographie gazeuse (GC) par séparation sur une colonne HP-5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm, Agilent, France) sous un débit d'hélium de 4 mL/min. Afin d'identifier les acides gras, des solutions de standards méthylés de longueur de chaine allant de 4 à 24 carbones (saturés ou non) ont été séparées et analysées ainsi que l'acide 3-hydroxydécanoïque. (#18919-1AMP, #49453-U, #H3648, Sigma-Aldrich). Le programme utilisé était le suivant : 50 °C 1 min, de 50 à 200°C en 3 min (50°C/min), de 200 à 240°C en 8 min (5°C/min), de 240 à 290°C en 1 min (50°C/min). Les molécules ont été analysées par un détecteur à ionisation de flamme (FID) à 300°C.

7. Analyse des molécules volatiles

Après fermentation des laits fermentés 18h à 22°C, 10 mL sont incorporés dans des vials de 20 mL lesquels sont fermés hermétiquement et stockés à 7°C pendant 21 jours. Les molécules volatiles présentes ont été extraites à l'aide d'une fibre de SPME (Carboxen™/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (57325-U, Supelco). Les vials ont été préchauffés à 50°C pendant 30 minutes. Puis, l'extraction des molécules a été réalisée par immersion de la fibre dans la phase gazeuse de l'échantillon pendant 1 heure à 50 °C.

La séparation et l'analyse des composés volatiles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS (GC 7890 A, MS 5975 C, Agilent). Les molécules fixées sur des fibres de micro-extraction en phase solide (SPME). Ces fibres ont été désorbées directement dans l'injecteur de la GC qui est placé au préalable à 250 °C pendant 5 minutes. La séparation des composés est effectuée à l'aide d'une colonne capillaire (122-7032, DB-WAX, 30 m, 0.25 mm, 0.25µm, Agilent). L'hélium est le gaz vecteur utilisé à un débit de 1 mL/min. Le gradient de température du four est constitué d'un plateau à

40 °C pendant 5 minutes puis il augmente de 7 °C par minute jusqu'à atteindre 140 °C, puis de 13°C par minute jusqu'à atteindre 250 °C. Cette température est alors maintenue pendant 2 minutes. Les paramètres de détection en spectrométrie de masse sont : ionisation électronique positive, 70 eV, full-scan mode, masse (m)/ charge (z) = 35-400 uma (unité de masse atomique), température d'interface à 300 °C.

E. Accroissement de la production de molécules antifongiques par mutagénèse aléatoire

Afin d'accroître la production de molécules inhibitrices, deux approches de mutagenèse aléatoire ont été utilisées : traitement UV et transposition. Le traitement UV permet de générer rapidement une banque de mutants d'irradiation. De plus, un mutant surproducteur obtenu par cette approche ne serait pas considéré comme un organisme génétiquement modifié (OGM) du point de vue de la législation et donc applicable en matrice alimentaire. La mutagénèse par irradiation UV a notamment permis d'augmenter la production d'acide lactique chez une souche de *Lactobacillus lactis* **(Joshi *et al.,* 2010)**. A l'inverse, les mutants obtenus par transposition sont considérés comme OGM (entrée d'ADN exogène dans la cellule), et ne sont pas applicables en matrice alimentaire. Cependant, dans l'éventualité d'un mutant sous- ou non-producteur, l'identification du ou des gènes mutés peut permettre de comprendre la voie de biosynthèse impliquée dans la production des molécules actives.

1. Mutagénèse par irradiation UV

A partir d'une colonie isolée de *L. rhamnosus* 5326 ou de *L. casei* 7006, une préculture de 18h est réalisée dans 10 mL de MRS à 37°C. Elle a été diluée au 100^{e} et cultivée à la même température pendant 4 h. Après centrifugation à 8 000 g pendant 5 min, le culot a été lavé 2 fois avec le même volume de NaCl 0,9% (p/v) puis repris avec 10 mL de cette même solution saline. Ensuite, ces suspensions ont été irradiées à 10000, 15000, 20000 et 25000 µJ/cm² (UVC 500 Crosslinker, Hoefer, Etats-Unis). Les suspensions ont été centrifugées (8 000 g, 10 min) et le culot a été repris avec du MRS additionné de glycérol 20 % afin de permettre la conservation à -80°C. L'objectif est d'obtenir un abattement de population de 99,99% par rapport à

des cellules non irradiées. Ainsi, un dénombrement des bactéries irradiées résistante a été réalisé en déposant 5 µL des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} de chaque culture irradiée sur gélose MRS. Ces boites ont été incubées en anaérobie à 37°C pendant 48 h. Après 48 h, la croissance sur boite a été comparée à celle de dilutions de cellules non irradiées pour définir la condition permettant d'obtenir l'abattement souhaité.

2. Mutagénèse par transposition

a. Par les plasmides pVI129 et pVI110

En 2012, Licandro-Seraut et son équipe décrivent la création d'un système de mutagenèse aléatoire par transposition pour *L. casei*. Il comprend deux plasmides : pVI129 et pVI110. Le pVI129 possède une origine de réplication (ORI) pour *Echerichia coli* ainsi qu'une origine de réplication thermosensible chez les bactéries à gram positif provenant du pIP501, deux gènes de résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline, et un gène codant pour une transposase TpaseIS1223. Il s'agit d'un plasmide à faible nombre de copies. Sans pression de sélection, son maintien de celui-ci est estimé à 86% par génération chez *L. casei* LC334 **(Licandro-Seraut *et al.,* 2012)**. Le plasmide pVI110 possède une origine de réplication (ORI) pBR322ori permettant son maintien chez *E. coli* mais ne possède pas d'ORI fonctionnelle chez les bactéries à gram positif. Il contient également un gène de résistance à l'érythromycine et une séquence reconnue par la transposase Tpase IS1223 à laquelle il servira de substrat. Ainsi, après une première transformation des bactéries avec le plasmide pVI129, une deuxième est réalisée avec le vecteur suicide pVI110 à 37°C (Figure 25). Suite à cette transformation, les clones ayant intégré le plasmide pVI110 dans leur génome par action de la Tpase IS1223 sont sélectionnés sur milieu MRS à 10µg/mL d'Erythromycine à 42°C.

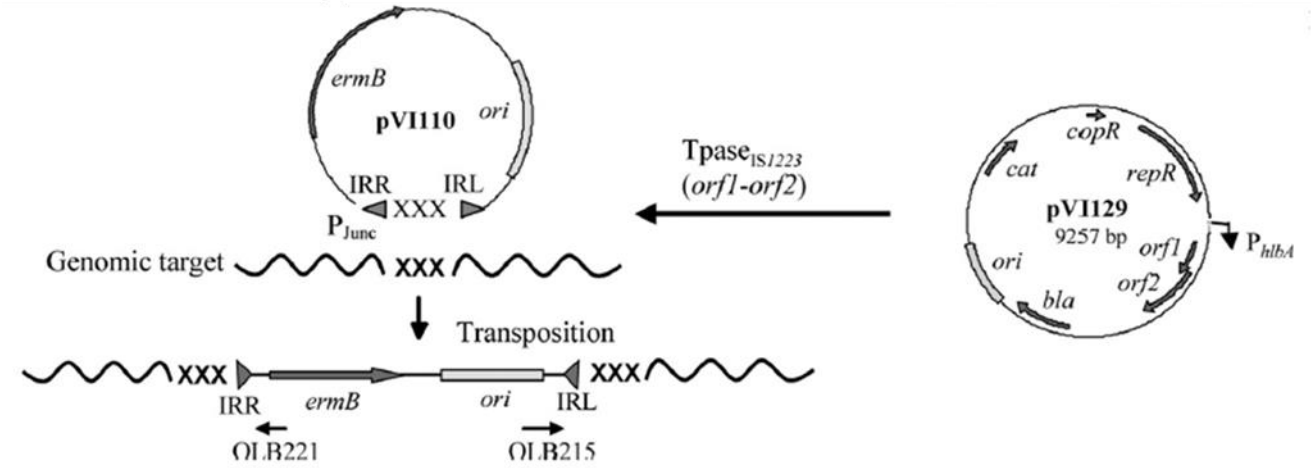


Figure 25 : Représentation schématique du système permettant de générer la transposition aléatoire du plasmide pVI110 chez *L. casei* par l'expression de la transposase TpsaIS1223 portée par pVI129 (issus de **Licandro-serrault *et al.*, 2012**).

b. Par le plasmide pPH-M1

En 2014, Hemarajata et son équipe décrivent un système de transposition aléatoire chez *Lactobacillus reuteri*. Ce système est basé sur le plasmide pPH-M1, possédant un gène codant un facteur de réplication thermosensible chez les bactéries à gram positif : *repA*(*Ts*) **(Hemarajata *et al.*, 2014)**. Ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol (cat), une transposase codée par le gène himar1c9 et inductible par la nisine, un gène de résistance à l'érythromycine encadré par deux séquence ITR reconnues par Himar1C9 (transposon) (Figure 26).

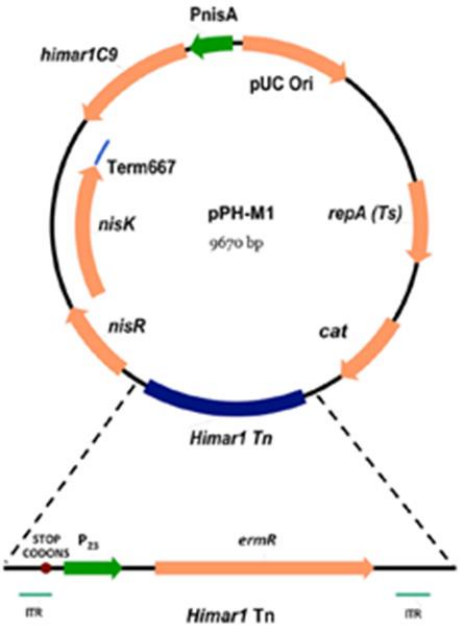


Figure 26 : Représentation schématique du vecteur pPH-M1 permettant de générer la transposition aléatoire du transposon Himar1Tn chez *L. reuteri* par l'expression inductible par la nisine de la transposase Himar 1C9 (issu de **Hemarajata *et al.*, 2014**) ;

c. Transformation de souches de lactobacilles

La capacité des bactéries à être transformées étant très variable, plusieurs protocoles de transformation ont été testés.

c.1 *Protocole 1 (Licandro-Seraut* et al.*, 2012)*

Les cellules de *Lactobacillus* compétentes ont été préparées comme suit. Une colonie est inoculée dans 10 mL de MRS puis la suspension est incubée à 37°C pendant 18h. 200 mL de milieu MRS préchauffé à 37°C sont inoculés avec 4 mL de cette pré-culture puis incubés à cette même température jusqu'à DO_{600nm} ~ 0,5-0,7. La culture bactérienne est centrifugée à 4500g à 4°C pendant 10 min puis lavée avec 200 mL d'eau ultra pure à 4°C. Cette opération est répétée une deuxième fois puis les cellules bactériennes sont re-suspendues dans 500 µL de PEG-1500 (polyéthylène glycol de 1500 Da de masse moyenne) à 300 g/L à 4°C.

Un volume de 50 µL de ces cellules compétentes sont placés dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Eurogentec CE-0002-50) avec une quantité variable de plasmide (de 1 à 10 µg) et incubés pendant 5 minutes dans la glace. La transformation par électroporation est réalisée à l'aide du Gene Pulser Xcell™ de BioRad avec un choc électrique de 2,2 kV, 25µF et 100 Ω. Les cellules sont

immédiatement transférées sur glace et laissées pendant 1 minute. Un ajout de 950 µL de milieu MRS est réalisé avant une incubation de 3h à 37°C.

La sélection des transformants est réalisée par étalement des cellules sur une gélose MRS contenant 10 µg/mL de Chloramphénicol suivi d'une incubation de 48h à 37°C.

c.2 *Protocole 2 (De Keersmaecker* et al., *2006)*

A partir d'une préculture de 24h en milieu MRS à 37°C, des dilutions, allant de 10^{-2} à 10^{-6}, ont été réalisées dans un milieu Gly-MRS (MRS + 20 g/L de glycine) et incubées 18h à 37°C. Les DO_{600nm} des cultures ensemencées sont mesurées et la culture dont la DO_{600nm} est comprise entre 0,8 et 1 est sélectionnée. Une nouvelle culture bactérienne de 100 mL en Gly-MRS est réalisée en ensemençant avec 5mL de cette préculture. Après 3h d'incubation à 37°C, de l'ampicilline est ajoutée à hauteur de 10 µg/mL. La culture est poursuivie pendant 1h. Après centrifugation à 6 000g pendant 10 min, les cellules sont lavées deux fois avec 50 mL de TSM (saccharose 171 g/L, $MgCl_2$, $6H_2O$ 0,2 g/L, KH_2PO_4 5,6 mM, K_2HPO_4 1,4 mM,). Le culot bactérien est repris avec 500 µL de TSM avant électroporation.

Un volume de 100 µL de ces cellules compétentes et 1 µg de plasmide pVI129 sont placés dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Eurogentec CE-0002-50). L'électroporation est réalisée à l'aide du Gene Pulser Xcell™ de BioRad avec un choc électrique de. 1.7 kV; 25 µF et 200 Ω. Les cellules sont immédiatement diluées dans 5 mL de MRS contenant 2 mM de $CaCl_2$ et 20 mM de $MgCl_2$ et incubées à 37°C pendant 3h.

La sélection des transformants est réalisée par étalement des cellules sur une gélose MRS contenant 10 µg/mL de chloramphénicol suivi d'une incubation de 48h à 37°C.

c.3 *Protocole 3 (Palomino* et al.*, 2010)*

A partir d'une préculture en milieu MRS à 37°C pendant 18h, un volume de 1mL est inoculé dans 100 mL de milieu MRS contenant du NaCl 0,9 M. Cette suspension est incubée jusqu'à DO600nm = 2 – 2,5. La culture est alors placée dans de la glace pendant 10 minutes pour stopper la croissance. Après centrifugation à 8 000g pendant 10 min à 4°C, les cellules sont lavées deux fois successivement

dans de l'eau ultra pure froide. Les cellules sont resuspendues dans 1 mL d'eau ultra pure.

Comme pour le protocole 1 (III-E-1-c1), 50 µL de ces cellules compétentes sont transformées avec des quantités variables de plasmide (de 1 à 10 µg). L'électroporation est réalisée avec un choc électrique de 2.5 KV, 200 Ω et 25 µF. Un ajout de 950 µL de milieu MRS est réalisé avant une incubation de 3h à 37°C.

La sélection des transformants est réalisée par étalement des cellules sur une gélose MRS contenant 10 µg/mL de Chloramphénicol suivi d'une incubation de 48h à 37°C.

c.4 *Protocole 4 (Landete* et al.*, 2014)*

A partir d'une préculture en milieu MRS des lactobacilles à transformer, du MRS contenant 1% de glycine et 0,5 M de sucrose est inoculé au ratio 1:50 et la suspension est cultivée à 37°C jusqu'à obtention d'un DO_{600nm}=0,6. La culture bactérienne est centrifugée à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé trois fois par une solution contenant du KH_2PO_4 à 5 mM, du $MgCl_2$ à 2 mM, du glycérol à 10% (v/v) et du sucrose à 0,3 M. Les bactéries sont alors reprises au 1/100^e du volume de culture dans le même tampon.

Pour chaque transformation, 50 µL des cellules compétentes sont placés dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Eurogentec CE-0002-50) avec des quantités variables de plasmide. L'électroporation est réalisée à l'aide du Gene Pulser Xcell™ de BioRad avec un choc électrique de 1,7 kV, 200 Ω et 25 µF. Après électroporation, les cellules sont resuspendues dans 950 µL d'un milieu MRS contenant du sucrose à 0,3 M, du $MgCl_2$ à 20 mM et du $CaCl_2$ à 2 mM. Cette suspension est incubée à 37°C en anaérobie durant 2,5 h. Les cellules transformées sont par la suite sélectionnées par étalement sur milieu gélosé MRS contenant 10 µg/mL de Chloramphénicol et 10 µg/mL d'Erythromycine et incubation 48h à 30°C en condition anaérobie.

c.5 Vérification du curage du plasmide pVI129

La stabilité du plasmide est testée par deux cultures liquides successives de 18h en milieu MRS sans antibiotique. Ce curage a été testé dans une gamme de température de culture allant de 43 à 47°C. La population possédant toujours le plasmide pVI129 après ces cultures est dénombrée sur gélose MRS 10 µg/mL de Chloramphénicol.

3. Criblage de souches surproductrices

a. En milieu MRS

Pour cribler les souches potentiellement surproductrices de molécules antifongiques, une suspension de mutants irradiés aux UV a été réalisée à 3.10^2 cellules/mL. Un volume de 100µL de cette suspension a été étalé sur une gélose MRS incubée pendant 48h à 37°C. Par la suite, 6 mL d'une gélose molle d'YM, inoculée à 1% avec une culture fraiche de *C. intermedia* 3669, sont coulés à la surface de la boite laquelle est incubée 24h à 25°C. Lorsqu'une colonie est entourée d'un halo d'inhibition des levures plus important qu'un clone non irradié, il est isolé sur milieu MRS + cycloheximide 12,5 µg/mL (antifongique actif contre les levures), puis incubé à 37°C pendant 24h. Par la suite, les surnageants de culture (24h à 37°C en milieu MRS) de la souche sauvage et de ces mutants de *Lactobacillus* sont testés en microplaques contre *Candida* de manière qualitative (III-C-2-a) avec différents rapports de volume de surnageant/volume de *Candida* : ½, ¼ et ⅛. Les microplaques sont incubées à 25°C sous agitation pendant 24h.

b. En milieu lait

Dans le but d'identifier des mutants présentant une plus forte activité antifongique, un test de criblage en gélose lait (poudre de lait (BioProx) 12 %, agar 1 %) a été mis au point. La levure *R. mucilaginosa* 3671 a été choisie comme contaminant car elle possède une couleur rose marquée, ce qui permet d'évaluer aisément sa croissance sur une gélose lait blanche. Pour évaluer la sensibilité du test, une souche active (*L. casei* 7006) et une souche inactive (*L. casei* 6960) ont été utilisées comme suit. A partir d'une préculture de 22 h à 37°C des souches en MRS, des dilutions ont été réalisées en plaque 96 puits en MRS, PBS 1X ou NaCl 0,9% (+

Tween 80 0,01 %), de manière à obtenir des concentrations de 2.10^8 à 2.10^2 UFC/puits. 10 µL de ces dilutions ont été déposées dans une seconde plaque 96 puits de manière à obtenir des concentrations finales de 10^7 à 10 UFC/puits. Ensuite, 190 µL de gélose lait ont été déposés dans chaque puits. Les effets de la durée d'incubation et de la température ont été testés : les plaques ont été incubées jusqu'à 48 h à une température de 22°C ou 30°C. Par la suite, une suspension de 2.10^3 UFC/mL de *R. mucilaginosa* 3671 a été réalisée en PBS 1X, et 10 µL de cette suspension ont été déposés dans chaque puits (20 UFC/puits). Les plaques ont été incubées à température ambiante et la croissance de *R. mucilaginosa* 3671 a été suivie quotidiennement pendant deux semaines.

IV - Résultats et discussion

A. Caractérisation de souches actives

Afin de caractériser les souches de lactobacilles possédant le spectre d'activité antifongique le plus large, des tests d'activité sur milieu gélosé ont été réalisés sur 18 souches de lactobacilles contre des moisissures et des levures issues de contaminations de matrices lactées. Le criblage des souches actives contre les moisissures a été directement réalisé sur un milieu choisi pour se rapprocher d'une activité potentielle en produit final, une gélose lait agar 10%. L'activité des dix-huit souches de lactobacilles a été testée contre cinq moisissures : *A. niger* 4624, *Mucor* 3652, *P. crustosum* 3673, *P. chrysogenum* 3674 et *P. roqueforti* 3675 (Tableau 8).

Lors de ce criblage, aucune souche de lactobacilles ne s'est révélée active contre la croissance de *Mucor* sp. 3652. Les moisissures *A. niger* 4624 et *P. chroygenum* 3674 se sont révélées, quant à elles, les plus sensibles aux différentes souches de *Lactobacillus*. Les trois souches de *L. rhamnosus* testées se sont révélées actives contre *A. niger* 4624 et contre les trois souches de *Penicillium.* Cependant, la souche *L. rhamnosus* 5718 a un spectre d'activité plus restreint que les souches 5326 et 6311 puisqu'elle n'inhibe pas la formation d'un mycélium chez *P. roqueforti* 3675.

En ce qui concerne les cinq souches de *L. plantarum*, les souches 5711 et 6660 apparaissent comme les plus efficaces sur la croissance des mycéliums de *P. crustosum* 3673 et *P. chrysogenum* 3674. A l'inverse des souches *L. rhamnosus* 5326 et 6311, les souches de *L. plantarum* ne montrent pas d'activité sur le développement de mycélium de *P. roqueforti* 3675. Ces souches apparaissent donc moins intéressantes contre ces cibles en matrice lactée.

Tableau 8 : Activité inhibitrice des différents lactobacilles inoculés dans une gélose lait vis-à-vis de cinq souches de moisissures contaminantes des produits laitiers après 7 jours de croissance.

Isolats		Moisissures cibles				
Espèces	Souche	*P. crustosum* 3673	*P. chrysogenum* 3674	*P. roqueforti* 3675	*A. niger* 4624	*Mucor sp.* 3652
Lactobacillus rhamnosus	5326	+	++	+	++	-
Lactobacillus rhamnosus	5718	+	++	-	++	-
Lactobacillus rhamnosus	6311	+	++	+	++	-
Lactobacillus plantarum	5329	+	-	-	+	-
Lactobacillus plantarum	5711	+	+	-	++	-
Lactobacillus plantarum	1096	-	+	-	+	-
Lactobacillus plantarum	6402	-	-	-	-	-
Lactobacillus pentosus/plantarum	6660	+	++	-	++	-
Lactobacillus casei	7006	+	++	+	++	-
Lactobacillus casei	6960	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	6575	+	++	-	++	-
Lactobacillus casei/paracasei	6630	+	+	-	++	-
Lactobacillus casei/paracasei	5661	+	++	+	++	-
Lactobacillus paracasei	6363	-	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	6795	+	++	+	++	-
Lactobacillus sp.	6796	+	++	-	++	-
Lactobacillus spicherii	6187	-	-	-	-	-
Lactobacillus zymae	6188	+	-	-	-	-

++ : Forte activité (développement de moisissures non visualisable) ; + : Faible activité (développement de moisissures avec absence de mycélium) ;- : Pas d'activité (présence d'un mycélium) (Figure 27)

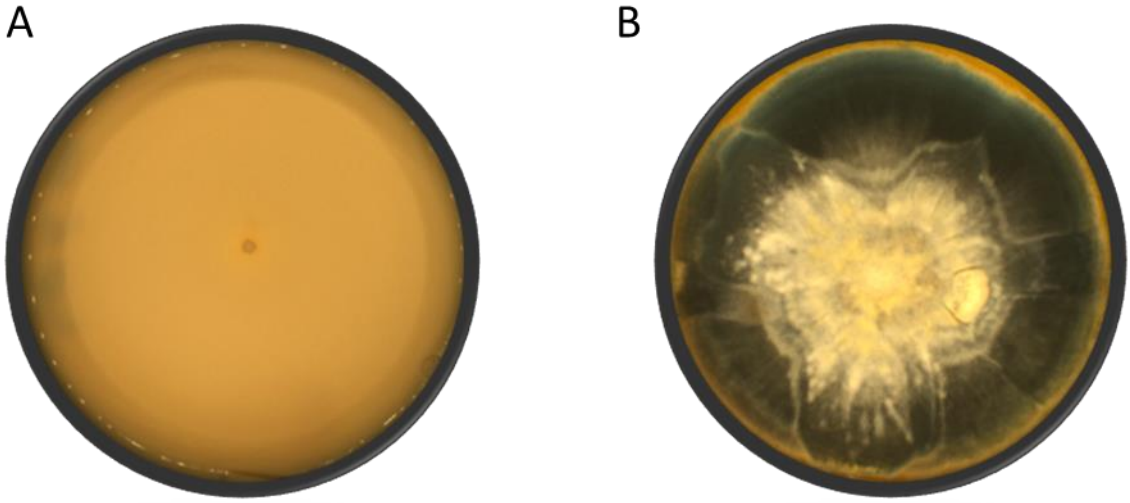


Figure 27 : Croissance de la souche *P. chrysogenum* 3674 après 14 jours à 25°C sur gélose lait avec lactobacilles. Les géloses ont été inoculées au préalable avec la souche *L. rhamnosus* 5326 (++) (A) et la souche *L. paracasei* 6363 (-) (B).

Six souches des espèces *L. casei* et *L. paracasei* ont été testées. Parmi elles, les souches *L. casei* 7006, *L. casei* 6575, *L. casei/paracasei* 6630 et *L. casei/paracasei* 5661 inhibent la formation de mycélium de *P. crustosum* 3673, *P. chrysogenum* 3674 et *A. niger* 4624. Cependant, les souches *L. case*i 7006 et 6575 se révèlent plus efficaces contre *P. chrysogenum* 3674 avec une absence totale de croissance. De plus, ces deux souches ont une activité antifongique supplémentaire contre *P. roqueforti* 3675. Les souches *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 ne présentent, quant à elles, aucune activité contre les cinq souches testées. Les souches *Lactobacillus* sp. 6795 et 6796 présentent une activité antifongique contre *P. crustosum* 3673, *P. chrysogenum* 3674 et *A. niger* 4624 avec une absence de mycélium formé. La souche *Lactobacillus* sp. 6795 montre une activité supplémentaire contre *P. roqueforti* 3675. Son spectre d'activité est similaire aux souches de *L. rhamnosus* et *L. casei* les plus actives. Les souches *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 ne présentent pas d'activité contre la formation d'un mycélium chez les cinq espèces de moisissures (excepté pour *L. zymae* 6188 contre *P. crustosum* 3673).

Ainsi, les souches *L. rhamnosus* 5326 et 6311, *L. casei* 7006, *L. casei/paracasei* 5661 et *Lactobacillus* sp. 6795 présentent le spectre d'activité le plus large contre les genres fongiques testés en milieu à base de lait.

La seconde partie du criblage de l'activité antifongique a été réalisée contre la croissance de quatre levures contaminantes des produits laitiers, *S. boulardii* 3667, *C. lusitaniae* 3668, *C. intermedia* 3669 et *R. mucilaginosa* 3671 (Tableau 9). L'activité antifongique est visualisée par l'absence de croissance des levures en gélose molle autour des stries de lactobacilles (Figure 28A).

Tableau 9 : Activité inhibitrice des différents *Lactobacillus* inoculés sur une gélose MRS vis-à-vis de quatre souches de levures contaminantes des produits laitiers.

Isolats		Levures cibles			
Espèces	Souches	*R. mucilaginosa 3671*	*C. intermedia 3669*	*C. lustianiae 3668*	*S. boulardii* 3667
Lactobacillus rhamnosus	5326	++	++	+	-
Lactobacillus rhamnosus	5718	++	++	-	-
Lactobacillus rhamnosus	6311	-	++	+	-
Lactobacillus plantarum	5329	+	++	-	-
Lactobacillus plantarum	5711	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	1096	+	++	-	-
Lactobacillus plantarum	6402	-	+	-	-
Lactobacillus pentosus/plantarum	6660	-	-	-	-
Lactobacillus casei	7006	++	++	+	-
Lactobacillus casei	6960	-	-	-	-
Lactobacillus casei	6575	-	-	-	-
Lactobacillus casei/paracasei	6630	-	-	-	-
Lactobacillus casei/paracasei	5661	+	+	-	-
Lactobacillus paracasei	6363	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	6795	++	++	+	-
Lactobacillus sp.	6796	+	+	-	-
Lactobacillus spicheri	6187	++	++	+	-
Lactobacillus zymae	6188	++	++	+	-

++ : Forte activité) ; + : Activité intermédiaire ; +/- : Faible activité ;

- : Pas d'inhibition des levures cibles

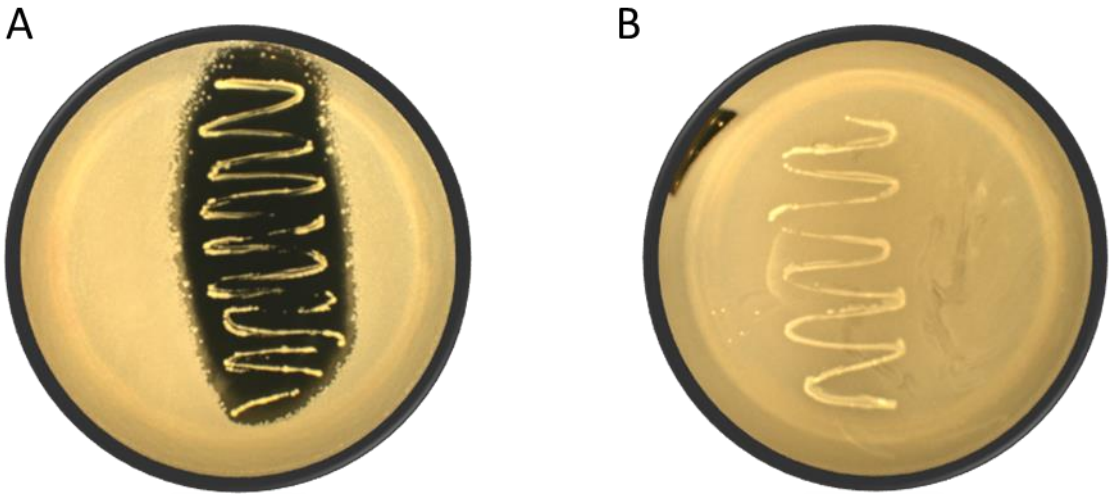


Figure 28 : Croissance de la souche *C. intermedia* 3669 en surcouche sur une gélose MRS inoculée avec lactobacilles. Les souches striées en surface sont *L. rhamnosus* 5326 (++) (A) ou la souche *L. paracasei* 6363 (-) (B).

Lors de ce deuxième criblage, aucune souche de *Lactobacillus* ne s'est montrée active contre la croissance de la levure *S. boulardii* 3667. Quant à elles, les levures *R. mucilaginosa* 3671 et *C. intermedia* 3669 se sont révélées être les plus sensibles aux différentes souches de *Lactobacillus*. Enfin la souche *C. lusitaniae* 3668 possède une sensibilité plus faible que *C. intermedia* 3669 aux différents *Lactobacillus* testés.

Les trois souches de *L. rhamnosus* testées montrent une activité contre la croissance de *C. intermedia* 3669. A l'inverse de la souche *L. rhamnosus* 5718, les souches *L. rhamnosus* 5326 et 6311 ont une activité contre la levure *C. lusitaniae* 3668. De même, les souches *L. rhamnosus* 5326 et 5718 possèdent une activité contre *R. mucilaginosa* 3671, à la différence de la souche *L. rhamnosus* 6311. Seule la souche *L. rhamnosus* 5326 est active contre ces trois levures.

Parmi les cinq souches de *L. plantarum*, seule *L. pentosus/plantarum* 6660 ne possède aucune activité contre les cibles testées. Les quatre souches *L. plantarum* 5329, 5711,1096 et 6402 sont toutes actives contre *C. intermedia* 3669. Seul *L. plantarum* 6402 ne possède pas d'activité contre *R. mucilaginosa* 3671 et à l'inverse, seul *L. plantarum* 5711 est actif contre *C. lusitaniae* 3668.

En ce qui concerne les espèces *casei* et *paracasei*, seules les souches *L. casei 7006* et *L. casei/paracasei* 5661 ont une activité anti-levure sur boite. La souche *L. casei/paracasei* 5661 possède une faible activité contre *R. mucilaginosa* 3671 et *C. intermedia* 3669. Quant à elle, la souche *L. casei* 7006 inhibe la croissance des trois levures *C. lusitaniae* 3668, *C. intermedia* 3669 et *R. mucilaginosa* 3671.

Les souches *Lactobacillus* sp. 6795 et 6796 possèdent une activité contre *C. intermedia* 3669 et *R. mucilaginosa* 3671. *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 empêchent également la croissance de *C. lusitaniae* 3668.

Parmi l'ensemble des souches testées, seules six souches ont présenté une activité contre les trois souches *C. lusitaniae* 3668, *C. intermedia* 3669 et *R. mucilaginosa* 3671 et donc le spectre d'activité le plus large. Quatre ont été retenues pour la suite de l'étude : *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188.

Les deux criblages réalisés ont permis de mettre en évidence deux souches ayant un spectre d'activité antifongique large contre les moisissures et levures issues de contaminations de produits laitiers : *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006. Toutefois, la suite de l'étude se focalisera principalement sur l'activité anti-levures. En effet, la résistance de ces espèces fongiques à de nombreux procédés en font un problème industriel majeur. Ainsi, les deux souches *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 ayant révélé un spectre d'activité large sur les trois levures *C. lusitaniae* 3668, *C. intermedia* 3669 et *R. mucilaginosa* 3671 apparaissent comme de bons candidats pour une application industrielle, même si leur activité anti-moisissure est très faible. De plus, les souches *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 ne sont actives ni contre les moisissures en milieu lait, ni contre les levures en milieu MRS. Ces souches seront donc sélectionnées pour la suite de notre étude en tant que témoins négatifs lors des tests d'activité et leurs paramètres de croissance comparés avec ceux des souches actives. L'activité de ces six souches est récapitulée dans le tableau 10.

Tableau 10 : Six souches sélectionnées pour l'étude

Souches sélectionnées	*Penicillium crustosum 3673*	*Penicillium chrysogenum 3674*	*Penicillium roqueforti 3675*	*Aspergillus niger 4624*	*Mucor sp. 3652*	*Rhodotorula mucilaginosa* 3671	*Candida intermedia* 3669	*Candida lusitaniae 3668*	*Saccharomyces boulardii 3667*
L. rhamnosus 5326	++	++	+	++	-	++	++	+	-
L. casei 7006	++	++	-	++	-	++	++	+	-
L. spicheri 6187	-	-	-	-	-	++	++	+	-
L. zymae 6188	-	-	-	-	-	++	++	+	-
L. paracasei 6363	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. casei 6960	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B. Nature des molécules antifongiques produites

Les lactobacilles sont des bactéries décrites pour avoir la capacité de sécréter de nombreuses molécules antifongiques de diverses natures : acides organiques (acide lactique, acétique, phényllactique, …), acides gras, composés protéiques, reuterine, peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, (Siedler *et al.,* 2019). Pour déterminer la nature chimique des molécules actives produites, chaque souche sélectionnée a été cultivée en milieu MRS. A l'issue de ces cultures, le surnageant a été stérilisé par filtration puis testé sur la croissance en YPD de *C. intermedia* 3669, levure contaminante la plus sensible aux molécules produites par *Lactobacillus* lors des étapes de criblage. Dans le Tableau 11, l'activité du surnageant contre cette levure est exprimée qualitativement en : détection de croissance (-) ou absence de croissance (+). Par la suite, un ensemble de tests biochimiques a été effectué sur les surnageants de culture comme décrit par Arena et son équipe en 2016. Les échantillons traités ont été à nouveau testés contre la croissance de *C. intermedia* 3669 (Tableau 11).

Parmi les dix-huit surnageants de lactobacilles cultivés en milieu MRS, trois ne présentent pas d'activité contre *C. intermedia* 3669 : ceux des souches *L. casei* 6960 et 6575 ainsi que celui de la souche *L. paracasei* 6363. La souche *Lactobacillus* sp. 6796 présente quant à elle un surnageant ralentissant la croissance de *C. intermedia* 3669. A la différence du criblage sur boite, les souches *L. pentosus/plantarum* 6660 et *L. casei/paracasei* 6630 présentent une activité dans leur surnageant de culture. La sensibilité du test d'activité antifongique en milieu liquide serait donc plus élevée que celui sur boite.

Tout d'abord, afin de déterminer la présence éventuelle d'une molécule antifongique de nature protéique, une digestion a été réalisée par action de la trypsine ou par celle de la protéinase K. À la suite de ces traitements, aucune perte de l'inhibition de *C. intermedia* 3669 n'a été observée. Les molécules actives ne sont donc probablement pas de nature peptidique.

Un traitement des surnageants à 120°C pendant 15 minutes a été réalisé afin de déterminer si les molécules actives présentes sont thermorésistantes. Il ne

modifie pas les propriétés antifongiques des surnageants, les molécules sont donc thermorésistantes. Ceci suggére le fait que ce ne soit pas des protéines, lesquelles auraient été dénaturées par la chaleur.

Les lactobacilles sont des bactéries fermentaires, elles sécrètent donc de nombreux acides tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide phényllactique, etc., modifiant ainsi le pH du milieu. Pour l'ensemble des souches étudiées, le pH du surnageant de culture, en milieu MRS, en phase stationnaire est compris entre 3,7 et 4,4. Lorsque celui-ci est augmenté à 5 par ajout de NaOH 10 M, on constate une perte de l'activité inhibitrice, démontrant que celle-ci est liée au pH et donc très probablement aux acides organiques produits, directement ou indirectement.

Tableau 11 : Effets de différents traitements biochimiques et physiques sur l'activité des surnageants de *Lactobacillus* contre la croissance de *C. intermedia* 3669.
+ : inhibition de croissance des cibles ; +/- : croissance moindre des levures cibles ; - : pas d'inhibition des levures cibles

Espèces	Souches	pH	Non traité	Trypsine	Protéinase K	Dénaturation thermique	pH 5
Lactobacillus rhamnosus	5326	3,73	+	+	+	+	-
Lactobacillus rhamnosus	5718	3,68	+	+	+	+	-
Lactobacillus rhamnosus	6311	3,75	+	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	5329	3,67	+	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	5711	3,65	+	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	1096	3,76	+	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	6402	3,65	+	+	+	+	-
Lactobacillus pentosus/plantarum	6660	3,88	+	+	+	+	-
Lactobacillus casei	7006	3,75	+	+	+	+	-
Lactobacillus casei	6960	4,3	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	6575	4,4	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei/paracasei	6630	4,01	+	+	+	+	-
Lactobacillus casei/paracasei	5661	3,75	+	+	+	+	-
Lactobacillus paracasei	6363	4,3	-	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	6795	3,69	+	+	+	+	-
Lactobacillus sp.	6796	3,95	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Lactobacillus spicherii	6187	4,15	+	+	+	+	-
Lactobacillus zymae	6188	3,8	+	+	+	+	-

Les surnageants des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 (possédant le plus large spectre d'activité) ont été soumis à une extraction en phase solide ("Solid Phase extraction" ou SPE) sur résine C18 afin de séparer les molécules actives. Différentes fractions ainsi obtenues ont été testées contre la croissance de *C. intermedia* 3669 (Tableau 12). Les seules fractions possédant une activité sont celles contenant les molécules non retenues sur la résine C18, indiquant la présence de molécules actives de nature polaire. L'ensemble de ces résultats suggérent qu'il pourrait s'agir d'acides organiques à chaines courtes, dont l'acide lactique soient impliqués dans l'activité antifongique.

Tableau 12 : Activité des fractions des surnageants en milieu MRS des souches de lactobacilles *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 obtenues par SPE contre la croissance de *C. intermedia* 3669 (- : pas d'activité de la fraction, + : activité de la fraction, +/- : faible activité de la fraction).

Fractions	***L. rhamnosus* 5326**	***L. casei* 7006**
Tampon citrate (pH 4)	-	-
Surnageant brut	+	+
Non retenues	+	+
Lavage	+/-	+/-
10% ACN	-	-
20% ACN	-	-
40% ACN	-	-
60% ACN	-	-
80% ACN	-	-
100% ACN	-	-

C. Analyse de l'activité des souches en MRS

Six souches ont été sélectionnées pour la suite de l'étude : 4 souches actives et 2 inactives. Pour faciliter la lecture des résultats, ces six souches ont été renommées : les souches ayant le spectre d'activité le plus large (moisissures et levures) *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006, les souches actives contre les levures (mais pas les moisissures) *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 et les souches sans activité *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960.

1. Milieu MRS-Glc

La production de métabolites antifongiques par les bactéries lactiques est liée à leur environnement de croissance (source de carbone, d'acides aminés, …). Depuis les années 60, le milieu MRS est défini comme un milieu de référence pour la culture des lactobacilles **(De Man *et al.*, 1960)**. Ce milieu riche contient du glucose en tant que source de carbone et de nombreuses sources d'acides aminés : peptone, extrait de viande et extrait de levures.

a. Population finale

Dans un premier temps, la population en UFC (unité formant colonie) finale des six souches actives de lactobacilles a été étudiée dans ce milieu (Figure 29A). Après 24h de culture, la biomasse des souches actives *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 en milieu MRS-Glc est de 3.10^8 et $4,7.10^8$ UFC/mL respectivement. Elle n'est pas significativement différente de celle des souches inactives *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 avec une concentration moyenne de $4,8.10^8$ et $2,6.10^8$ UFC/mL respectivement (Test de Student, p-value > 0,05). La population finale des souches *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 en milieu MRS-Glc est plus élevée avec $1,7.10^9$ et $2,5.10^9$ UFC/mL respectivement.

Le métabolisme fermentaire de ces bactéries entraine la production d'acides dans le milieu. Ainsi, le pH à 24h de croissance a été mesuré pour les six souches de lactobacilles et est présenté en Figure 29B. Le pH des souches actives se situe à des moyennes comprises entre 3,7 pour la souche *L. zymae* 6188 et 4,4 pour la souche *L. spicheri* 6187. Pour les deux souches ne présentant pas d'activité sur boite, *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960, le pH en fin de culture est de 4,3 et 4,4

respectivement. Le pH en fin de culture entre ces deux souches n'est donc pas significativement différent de celui de la souche *L. spicheri* 6187 (Test de Student, p-values > 0.05). Celui-ci est en revanche significativement différent entre les trois autres souches actives *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 avec 3,8, 3,7 et 3,7(Test de Student, p-values > 0.05).

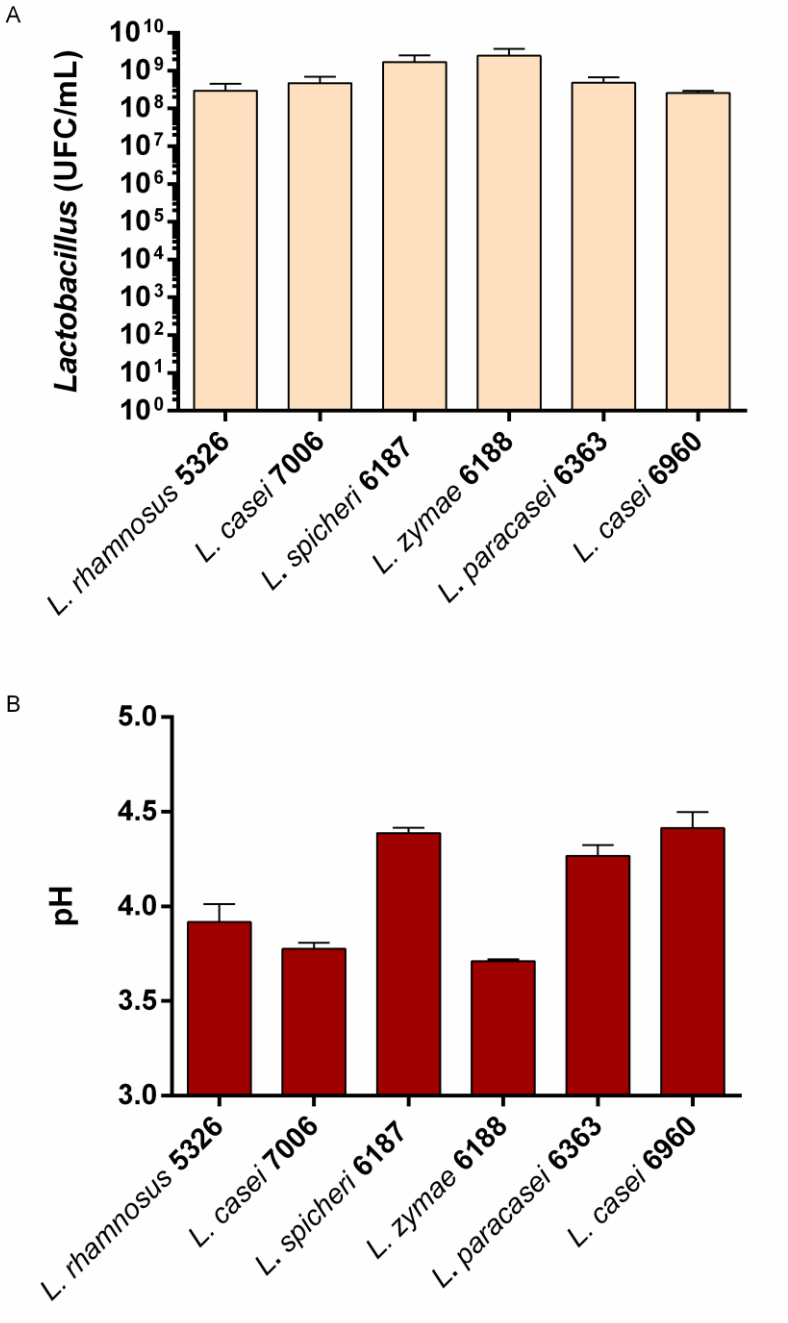


Figure 29 : Population finale en UFC/mL de milieu MRS (A) et pH final du milieu (B) (n=3).

b. Activité antifongique

L'activité de surnageants de culture en milieu MRS après 24h de croissance a été testée contre la croissance de la souche *C. intermedia* 3669, souche de levure cible la plus sensible sur milieu gélosé (Figure 30).

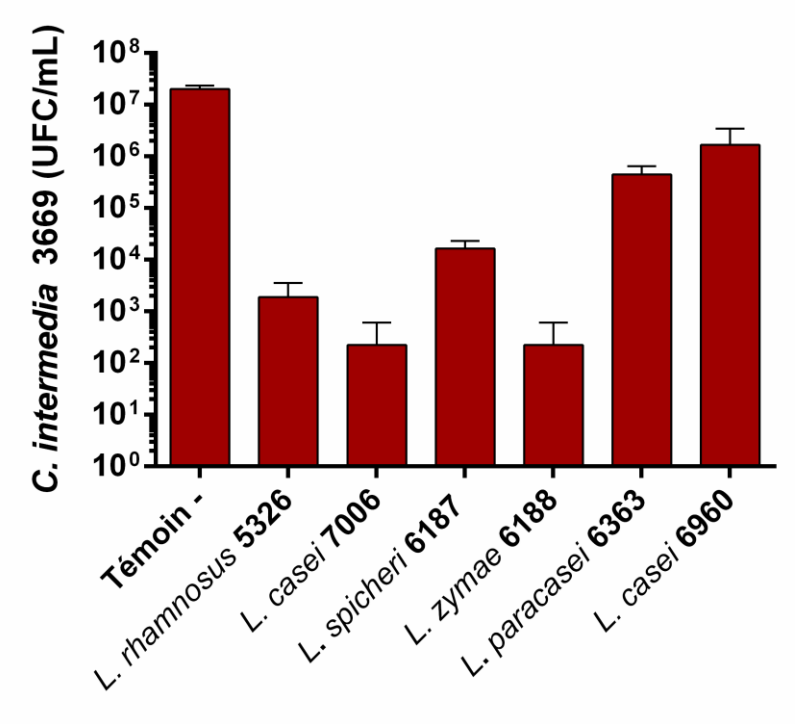


Figure 30 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des surnageants de cultures de lactobacilles. (n=3)

En l'absence de surnageant mais dans un milieu à pH contrôlé à 4,2 grâce à l'ajout de tampon citrate, la population de *C. intermedia* 3669 atteint en moyenne 2.10^7 UFC/mL après 24h. En présence du surnageant de la souche *L. rhamnosus* 5326, elle n'est que de $1,9.10^3$ UFC/mL après 24h, soit un différentiel de 4 log par rapport au témoin négatif. En présence des surnageants des souches *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188, elle diminue encore avec en moyenne $2,2.10^2$ UFC/mL, soit un différentiel de 5 log par rapport à la population témoin. Le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 possède une activité intermédiaire avec une population de *C. intermedia* 3669 de l'ordre de $1,6.10^4$ UFC/mL, soit un différentiel de 3 log par rapport au témoin. Enfin, en présence des surnageants des souches *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960, la croissance moyenne de *C. intermedia* 3669 est de $4,5.10^5$ et $1,4.10^6$ UFC/mL respectivement soit une différence d'environ 1 log. Ces souches

présentent donc une légère activité en milieu liquide contre la croissance de *C. intermedia* 3669 cependant plus faible et significativement différente de celle du surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 (Test de student, p-values < 0.05).

Les surnageants des souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 présentent donc la plus forte activité contre *C. intermedia* 3669 tandis que celle de la souche *L. spicheri* 6187 est moindre. Ces activités sont corrélées au pH des surnageants (Figure 29B). En effet, ceux dont les pH sont les plus élevés (4,2 - 4,4) ont les activités les plus faibles avec une croissance moyenne des levures cibles comprise entre $1,6.10^4$ et $1,4.10^6$ UFC/mL. A l'inverse, ceux aux pH les plus bas (3,7 - 3,9) ont les activités les plus élevées avec une croissance moyenne des levures cibles comprise entre $1.9.10^3$ et $2,2.10^2$ UFC/mL. Néanmoins ce paramètre seul ne peut expliquer les différences d'activités observées pour les surnageants des souches *L. spicheri* 6187, *L. paracasei* 6187 et *L. casei* 6960 dont le pH n'est pas significativement différent.

c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC

Les premiers tests réalisés avec les surnageants des souches actives montrent un lien entre l'activité contre *C. intermedia* 3669 et le pH du milieu. De plus, les molécules responsables de l'activité sont de nature polaire, et donc potentiellement des acides organiques à courtes chaines (lactique, acétique, …). Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont un métabolisme fermentaire obligatoire. Les espèces *casei*, *paracasei* et *rhamnosus* font partie du groupe B : les hétérofermentaires facultatives. Ainsi, les hexoses sont presque exclusivement fermentés en acide lactique par la voie d'EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) **(Holzapfel and Wood, 1995)**, celui-ci est donc l'acide majoritairement produit. Afin de quantifier l'acide lactique, le passage d'un standard a été réalisé par HPLC sur colonne Aminex HPX-87H (échangeuse d'ions) à un débit de 0,6 mL/min.

L'acide lactique est détecté, à une longueur d'onde de λ_{210nm}, à un temps de rétention de 11,8 minutes (Figure 31A). Par la suite, la relation linéaire entre l'aire (mAU/min) du pic chromatographique correspondant et sa concentration a été déterminée grâce à l'établissement d'une gamme étalon (Figure 31B). La gamme de linéarité pour le dosage de l'acide lactique, par cette méthode, est comprise entre les

concentrations 0,5 et 20 mM (soit entre 0,05 et 1,8 g/L). De la même manière, l'acide acétique est détecté à une longueur d'onde de λ_{210nm} avec un temps de rétention de 14,6 minutes. (Figure 31C). Par la suite, de la même manière que pour l'acide lactique, une gamme de linéarité a été établie et est comprise entre 10 et 150 mM (soit entre 0,6 et 9 g/L) (Figure 31D).

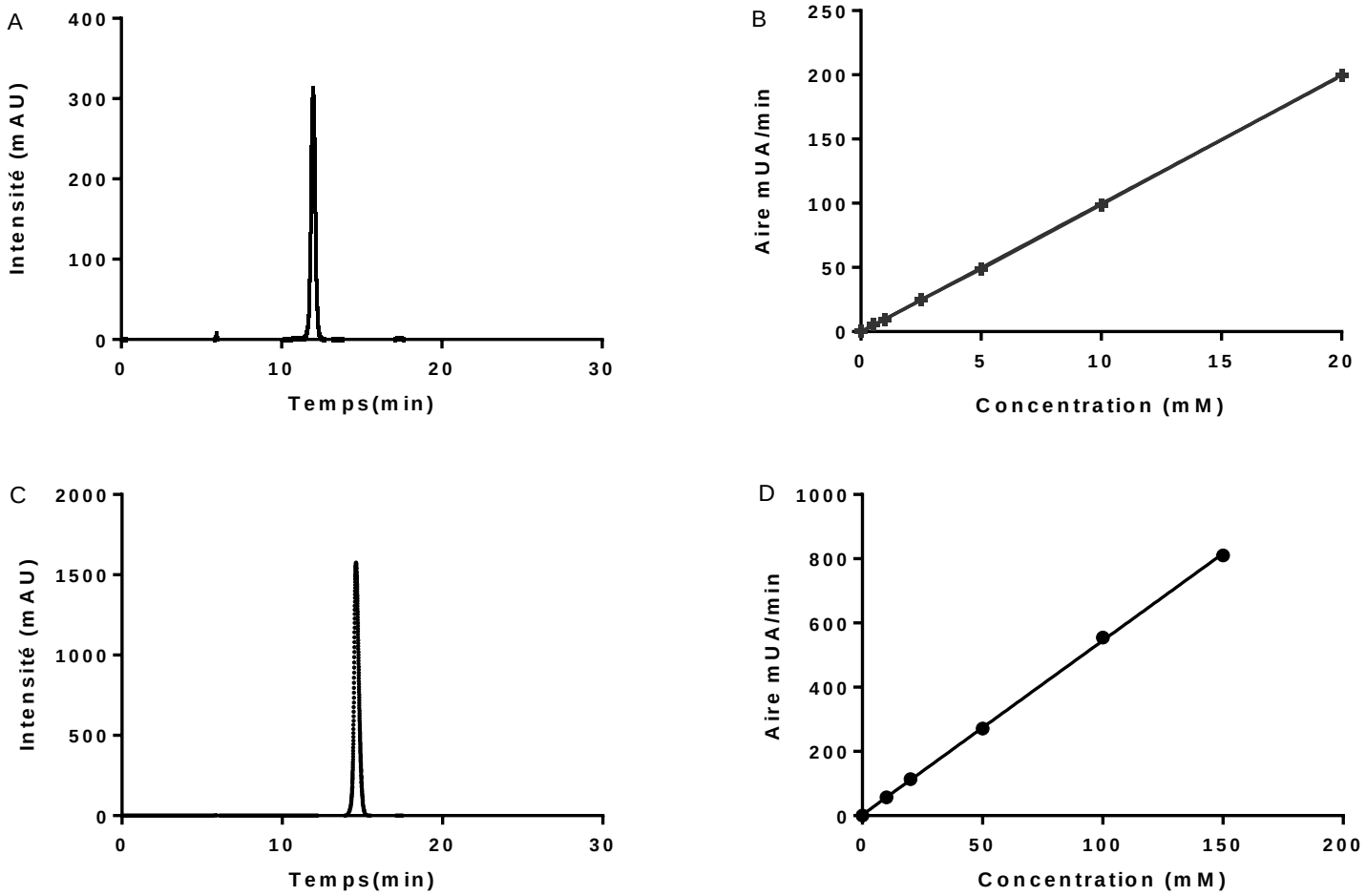


Figure 31 : Détermination du temps de rétention des acides lactique (A) et acétique (C) par HPLC lors du passage sur colonne Aminex HPX-87H à 0,6 mL/min, détection à $\lambda_{210\ nm}$. Détermination de la relation de linéarité entre la concentration en acide lactique en mM et l'aire sous la courbe obtenue (mAU/min) à 11,8 minutes. Droite obtenue : Y = 9,984*X - 0,3138 avec R^2= 0,9999(B). Détermination de la relation de linéarité entre la concentration en acide acétique et l'aire sous la courbe obtenue (mAU/min) à 14,6 minutes. Droite obtenue : Y = 5,423*X + 2,884 avec R^2= 0.999(D) (n=3).

L'acide lactique est l'acide majoritairement produit dans chaque surnageant en milieu MRS-Glc (Figure 32A). Les surnageants des trois souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 produisent respectivement en moyenne : 20,6, 22,8 et 25,4 g/L. Ces trois souches possèdent également la plus forte activité vis-à-vis de la croissance de la souche *C. intermedia* 3669 (de 4 à 5 log de réduction de population). Les surnageants des souches présentant une faible activité, *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960, contiennent moins d'acide lactique avec respectivement 16,1 et 10,2 g/L. Enfin, le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 possède une concentration en acide lactique de 15 g/L en moyenne. Pourtant, son activité est supérieure d'un log par rapport à celle des souches *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 (Test de Student, p-values < 0.05). Ces résultats laissent supposer que la concentration d'acide lactique n'est donc pas seule responsable de l'activité du surnageant contre la croissance de *C. intermedia* 3669. Le taux d'acide acétique (Figure 32B) se situe entre 1,5 et 2 g/L et n'est pas significativement différent entre les surnageants de lactobacilles (Test de Student, p-values > 0.05) sauf pour la souche *L. casei* 6960. Le milieu MRS contient 5 g/L d'acétate de sodium, soit environ 3,6 g d'acétate. Les concentrations retrouvées sont inférieures aux concentrations basales du milieu. Ce qui suggére soit une consommation de cet acétate par les lactobacilles, soit une limite de linéarité lors du dosage de cet acide.

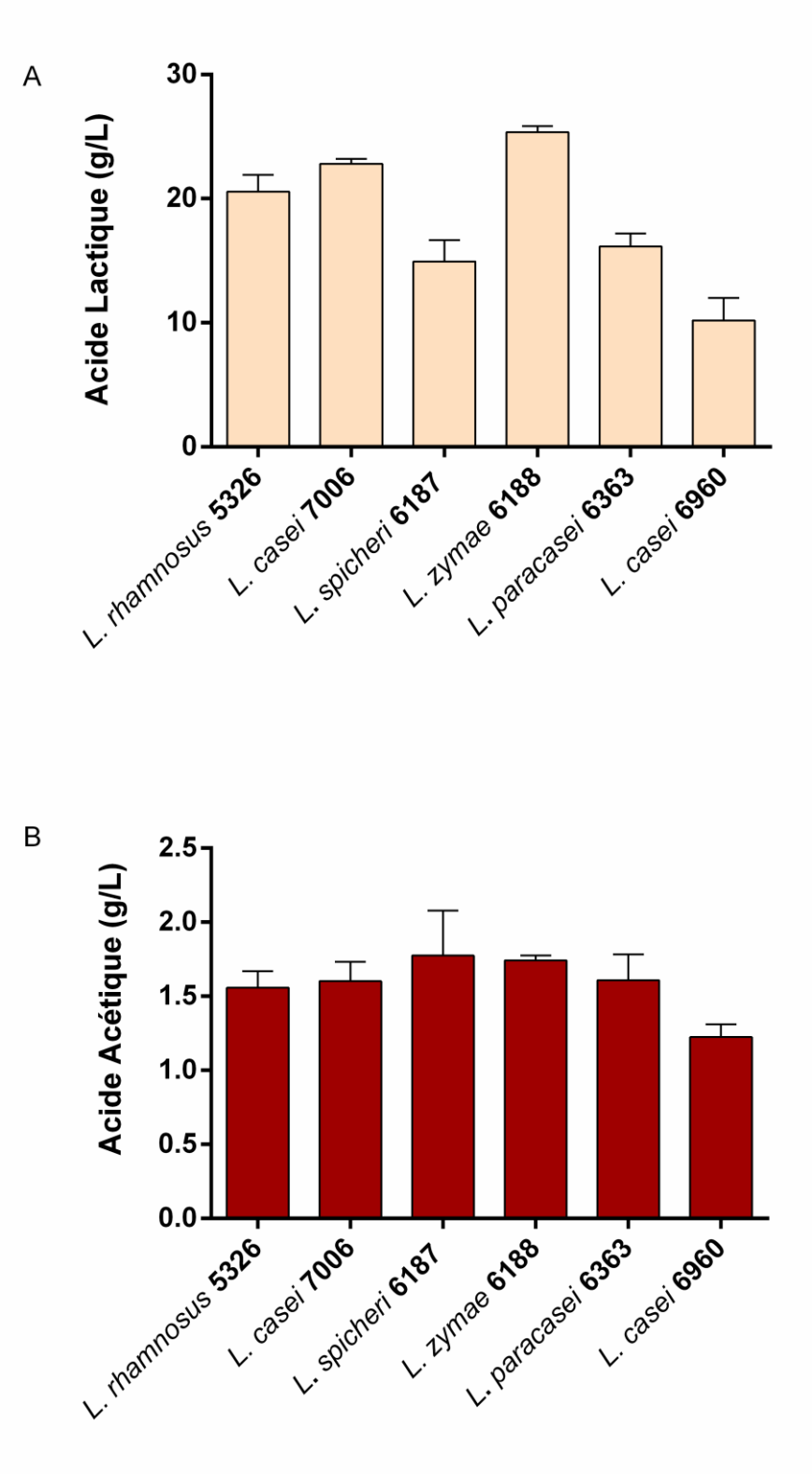


Figure 32 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Glc après 24h de croissance (n=3).

2. Milieu MRS-Lac

La production d'acide lactique en milieu MRS est réalisée par la conversion du glucose en pyruvate, lors de la glycolyse, puis en acide lactique via l'action de la lactate déshydrogénase, la LDH (Figure 3). Cependant, le principal glucide contenu dans le lait est un disaccharide : le lactose. Celui-ci est formé d'une molécule de β-D-galactose (Gal) et d'une molécule de β-D-glucose (Glc) reliées entre elles par une liaison osidique β(1→4). L'utilisation dans le métabolisme nécessite une hydrolyse par la β-galactosidase (ou par la phospho β-galactosidase) du lactose afin de libérer ces deux molécules. Le β-D-glucose peut alors rejoindre la voie de la glycolyse tandis que le β-D-galactose peut être métabolisé par deux alternatives : la voie de Leloir ou la voie du tagatose-6-phosphate **(Bettenbrock and Alpert, 1998; Frey, 1996; Wu and Shah, 2017)**.

Le changement de source de carbone peut engendrer un changement du métabolisme et donc, une modification de la production d'acides organiques dans le milieu. Ainsi, un milieu intermédiaire entre le milieu standard MRS et la matrice finale industrielle composée de lait a été réalisé : le MRS-lac. Celui-ci possède la même composition que le MRS-Glc hormis le fait que le lactose y remplace le glucose.

a. Population finale

Dans un premier temps, la population finale (en UFC/mL) et l'acidification du milieu des six souches de lactobacilles ont été étudiés dans ce milieu et comparés à ceux du milieu MRS-Glc (Figure 33A et 33B).

En MRS-lac, les biomasses finales des souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 ne présentent pas de différences significatives avec celles obtenues en MRS-Glc (Tests de Student, p-value > 0.05). De même, leur pH moyen est similaire avec des valeurs comprises entre 4 et 4,2. La souche *L. casei* 6960 cultivée en milieu MRS-Lac présente quant à elle une augmentation de sa population finale avec une valeur de $2{,}4.10^9$ UFC/mL en moyenne (Test de student, p-value = 0,0005). L'acidification du milieu de la souche *L. casei* 6960 diminue aussi légèrement, le pH moyen passe alors de 4,4 à 4,2. La souche *L. zymae* 6188 est également positivement impactée avec une croissance de $2{,}5.10^9$ UFC/mL en MRS-Glc par rapport à $6{,}6.10^9$ UFC/mL en MRS-Lac (Tests de Student, p-value = 0.0316).

Enfin, la souche *L. paracasei* 6363 voit sa croissance diminuer avec une population en MRS-Glc de $4{,}8.10^8$ UFC/mL par rapport à $7{,}9.10^7$ UFC/mL en MRS-Lac (Test de Student, p-value = 0,0245). La diminution du pH lors de la culture de cette souche en présence de lactose est bien plus faible qu'avec le glucose : 6,3 contre 4,3 ce qui peut être lié à la plus faible croissance bactérienne.

Ainsi, le changement de source de carbone influence positivement la biomasse finale des souches *L. casei* 7006, *L. casei* 6960 et *L. zymae* 6188 et négativement la biomasse finale de la souche *L. paracasei* 6363. Ce changement n'entraine pas de différence significative pour les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. spicheri* 6187.

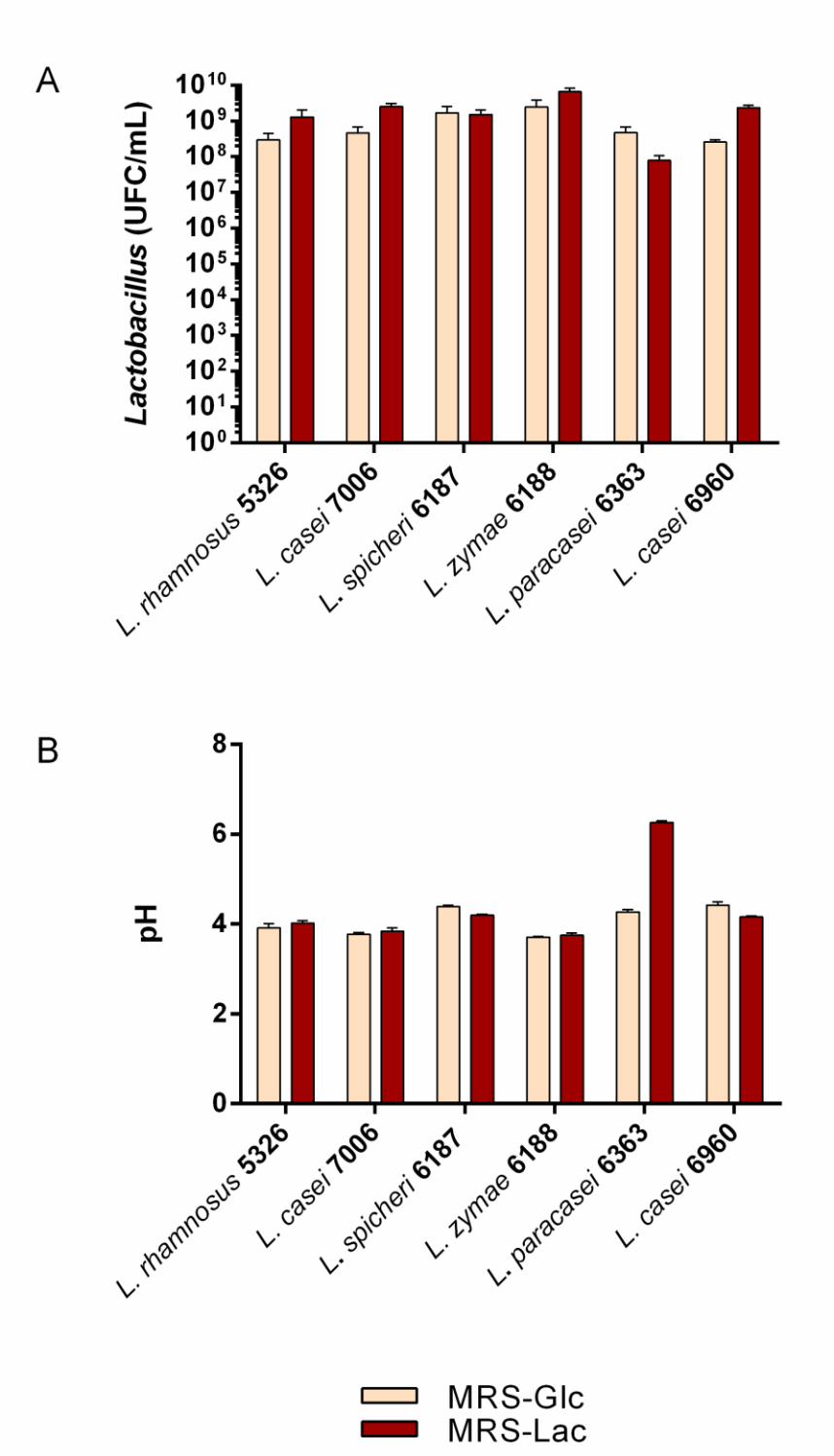


Figure 33 : Population finale de six souches de lactobacilles en milieu MRS-Glc et MRS-Lac en UFC/mL (A) et acidification finale du milieu (B) (n=3).

b. Activité antifongique

Par la suite, l'influence du lactose sur l'activité antifongique des surnageants des six souches analysées a été évaluée (Figure 34).

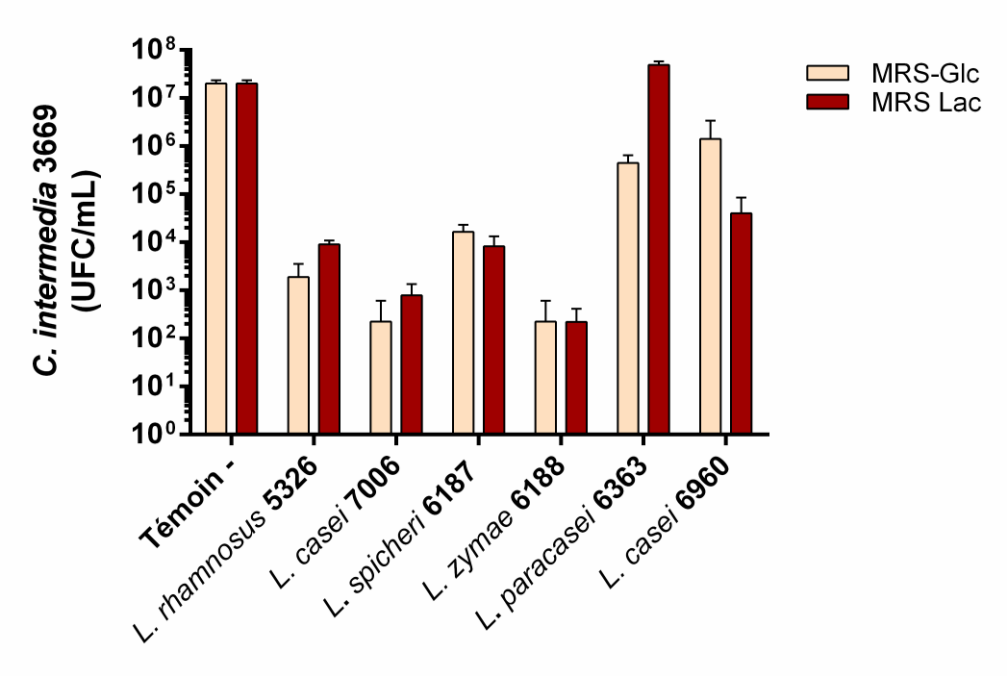


Figure 34 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture, lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants issus des cultures de *Lactobacillus* en milieu MRS-Glc et MRS-Lac. (n=3)

Comme en MRS-Glc, les surnageants de cultures en MRS-Lac les plus actifs sont ceux des souches *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 avec une croissance de la levure cible de $7{,}9.10^2$ et $2{,}2.10^2$ UFC/mL en moyenne contre 2.10^7 UFC/mL en l'absence de surnageant (5 log de différence). Cette activité n'est pas significativement différente de celle obtenue avec les surnageants de culture en MRS-Glc (Test de Student, p-value > 0.05).

Les surnageants des cultures des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. spicheri* 6187, obtenues par culture en milieu MRS-Lac, possèdent une activité inférieure avec une croissance de la levure cible de $9{,}1.10^3$ et $8{,}2.10^3$ UFC/mL respectivement. Ces inhibitions de croissance ne sont toutefois pas significativement différentes de celles obtenues avec le MRS-Glc (Test de student, p-value > 0,05). En revanche, le surnageant de la souche *L. casei* 6960 présente une augmentation d'activité : 4.10^4 UFC/mL en milieu MRS-Lac contre $1{,}4.10^6$ UFC/mL de *C. intermedia* 3669 en milieu

MRS-Glc. Cette augmentation semble corrélée à la croissance de cette même souche plus importante en milieu MRS-Lac. De même, la souche *L. paracasei* 6363, relativement peu active en milieu MRS-Glc, perd toute activité en milieu MRS-Lac avec une croissance de levures cibles de $4{,}8.10^7$ UFC/mL, similaire au contrôle.

c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC

En milieu MRS-Lac, la quantité d'acide lactique retrouvée dans le surnageant de *L. spicheri* 6187 (17,5 g/L) n'est pas significativement différente de celle retrouvée dans celui de la souche *L. casei* 7006 (18,5 g/L). Cependant, une différence significative d'inhibition est retrouvée avec une croissance de *C. intermedia* 3669 de $7{,}9.10^2$ UFC/mL pour le surnageant de *L. casei* 7006 contre $8{,}2.10^3$ UFC/mL pour celui de *L. spicheri* 6187 (Test de Student, p-value = 0,048). Cette différence suggère également la présence d'autres molécules actives dans le surnageant de la souche *L. casei* 7006, absentes ou en moindre quantité dans le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187.

La quantité d'acide acétique retrouvé dans les surnageant de culture n'est pas significativement différente entre un milieu MRS-Glc et MRS-Lac avec des valeurs moyennes de 1,5 g/L. Le milieu MRS contient initialement 5 g/L d'acétate de sodium. Il peut être considéré comme un antifongique agissant en synergie avec l'acide lactique. Cet effet a notamment été montré dans certaines études **(Schillinger and Villarreal, 2010; Stiles *et al.,* 2002)**.

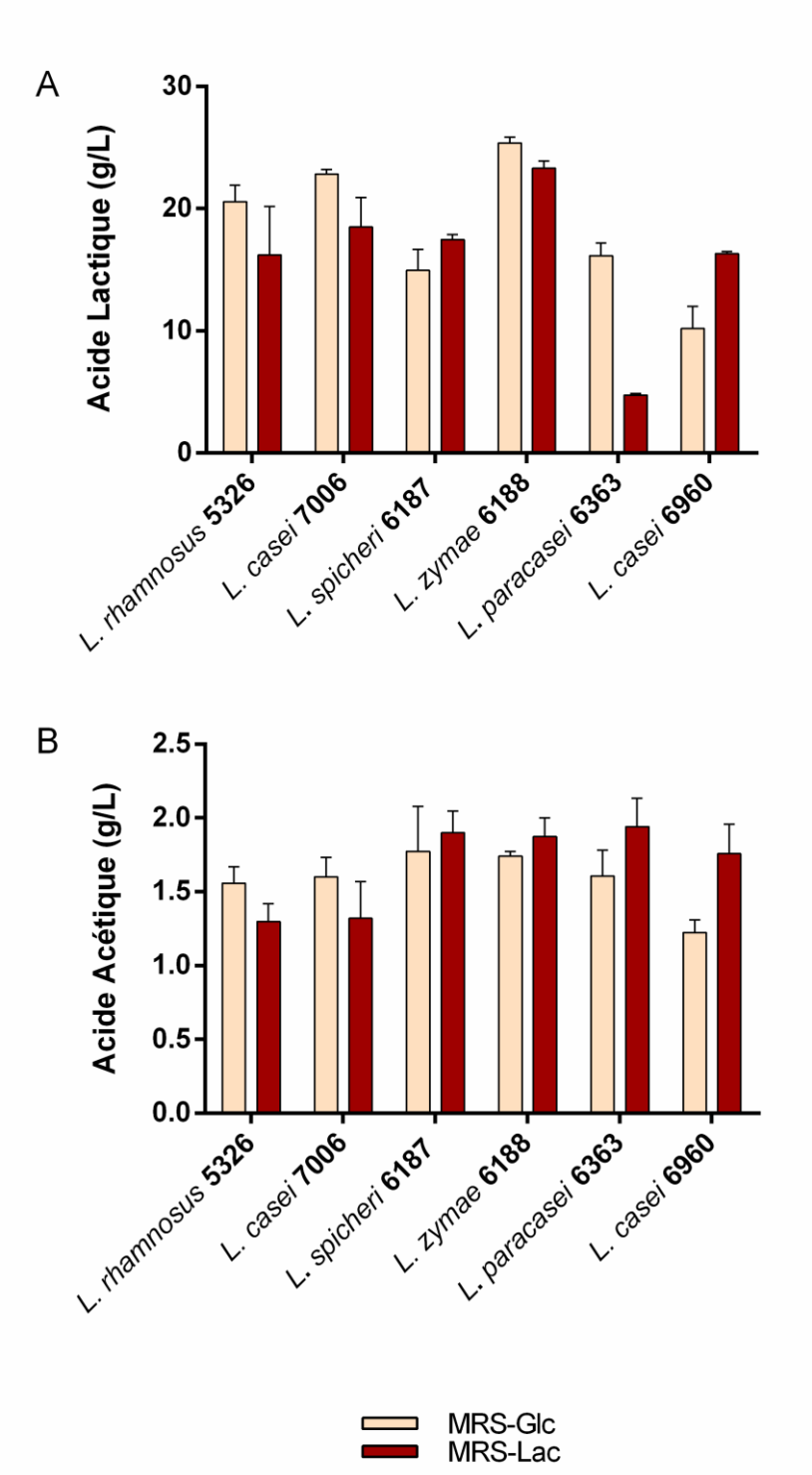


Figure 35 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvés dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Lac et MRS-Glc après 24h de croissance (n=3)

3. MRS-sAc

La présence d'acétate de sodium dans le milieu MRS conduit à sa conversion en acide acétique lors de la diminution de pH associée à la production d'acide lactique dans le milieu. Pour évaluer l'interférence de cet acide lors du criblage de souche antifongique, un milieu sans acétate de sodium a été réalisé (MRS-sAc).

a. Population finale

La population fianle des six souches de lactobacilles et l'acidification de leur milieu de culture ont donc été mesurés après 24h de croissance ainsi que l'activité des surnageants de culture dans ce milieu (Figure 36A et 36B). La croissance des souches de lactobacilles n'est pas affectée par l'absence d'acétate de sodium puisque aucune différence significative n'est détectée entre MRS et MRS-sAc (Test de Student > 0,05) (Figure 36A). Cependant, le pH en fin de culture pour toutes les souches est légèrement plus faible dans un milieu sans acétate de sodium avec des valeurs moyennes comprises entre 3,5 et 4 (Figure 36B).

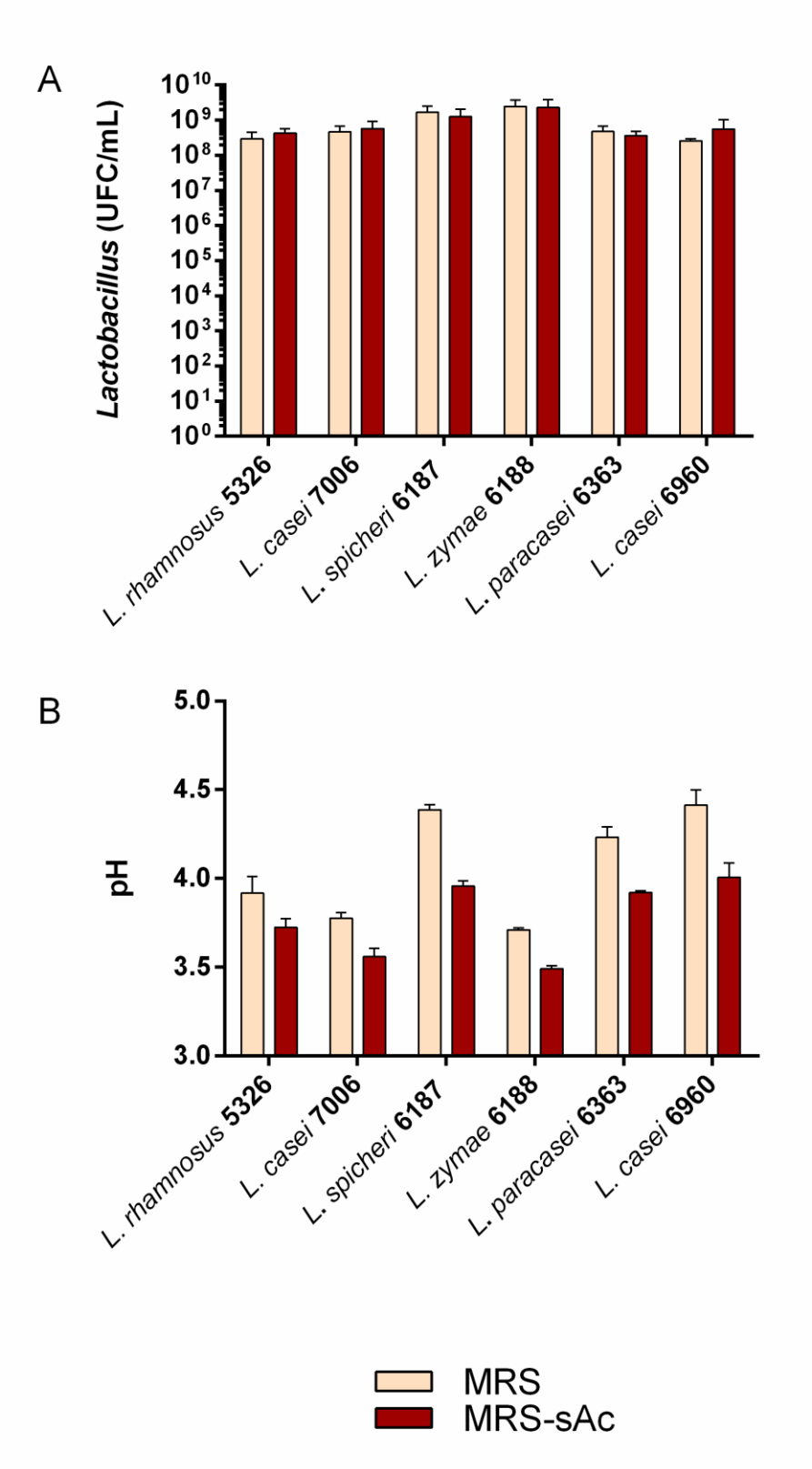


Figure 36 : Influence de la présence d'acétate de sodium dans le milieu MRS-Glc sur la population finale de six souches de lactobacilles UFC/mL (A) et sur l'acidification finale de milieu (B) après 24h de croissance (n=3).

b. Activité antifongique

L'activité des surnageants de culture en milieu MRS-sAc a ensuite été comparée à celle obtenue en MRS (Figure 37). L'absence d'acétate de sodium entraine une perte totale de l'activité des surnageants de toutes les souches de lactobacilles. En effet, il n'y a aucun effet significatif sur la croissance de *C. intermedia* 3669 quel que soit le surnageant de culture en MRS-sAC considéré (population à 24h d'environ 10^8 UFC/mL). Cette perte d'activité n'est pas liée à la croissance des lactobacilles au sein de ce milieu car il n'y a pas de différence significative de croissance avec le MRS (Figure 36A). Elle n'est pas non plus due à un déficit d'acidification puisque le pH des surnageants est légèrement inférieur en MRS-sAc (Figure 36B).

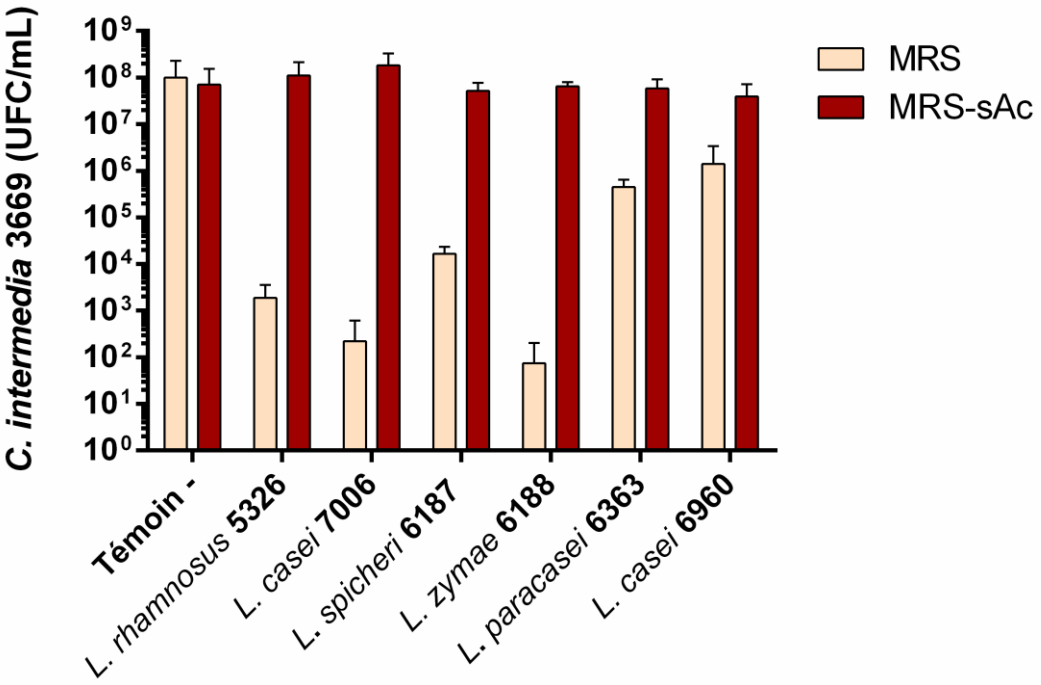


Figure 37 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants des cultures de lactobacilles en milieu MRS-Glc avec ou sans acétate de sodium (n=3).

c. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC

Un dosage d'acide lactique et d'acide acétique des surnageants obtenus en milieu MRS-sAc a été réalisé (Figure 38). La production d'acide lactique par les six souches de lactobacilles étudiées est significativement différente entre les cultures en MRS avec ou sans acétate de sodium. En effet, on constate pour chaque souche une chute de la production d'acide lactique. Les souches les plus actives en MRS, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188, ne produisent plus que 13,5 et 16 g/L contre 23 et 25 g/L respectivement. Ces taux d'acide lactique sont similaires à ceux obtenus dans le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 cultivée en milieu MRS avec acétate de sodium avec en moyenne 15 g/L. Ce surnageant possède cependant une activité contre *C. intermedia* 3669 en inhibant sa croissance de 3 log (Figure 37). Cependant en MRS sans acétate de sodium la souche *L. spicheri* 6187, ainsi que les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. paracasei* 6363, voient leur production diminuer avec 9,5 10,5 et 8,9 g/L d'acide lactique contre 15, 20,5, et 16 g/L en MRS-Glc respectivement. A l'inverse des autres souches, *L. casei* 6960 n'est pas impactée dans sa production (Test de Student, p-value = 0,1377). En ce qui concerne l'acide acétique, il n'est pas détecté dans le milieu MRS sans acétate de sodium excepté pour la souche *L. spicheri* 6187 à une moyenne faible de 0,13 g/L.

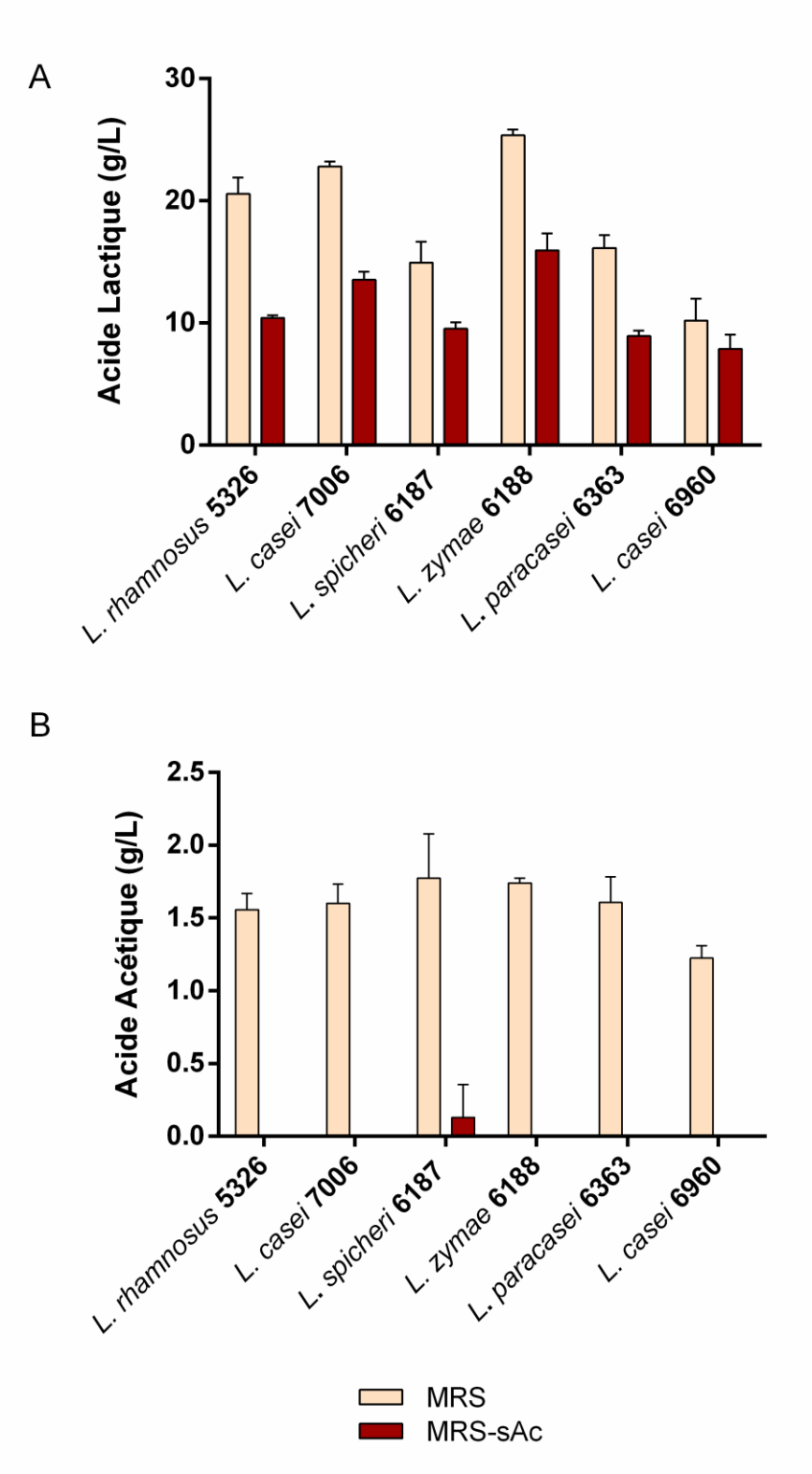


Figure 38 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS avec ou sans acétate de sodium après 24h de croissance (n=3).

L'acide lactique est l'antifongique le plus produit par les lactobacilles, il permet la diminution du pH du milieu perturbant ainsi le gradient électrochimique des membranes des cellules **(Eklund, 1989)**. La diminution de la production de cet acide est donc cohérente avec la diminution de l'activité antifongique des surnageants. Cependant, elle ne permet pas d'expliquer en totalité la perte d'activité des surnageants des souches *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188. Ces surnageants ont une quantité d'acide lactique similaire à celle de la souche *L. spicheri* 6187 en MRS-Glc qui possède une activité contre *C. intermedia* 3669. L'acide acétique est un inhibiteur de croissance plus efficace que l'acide lactique en raison de sa valeur de pKa plus élevée (4,75 pour l'acide acétique contre 3,86 pour l'acide lactique) et est présent en plus grande proportion sous forme protonée dans les surnageants **(Christieans *et al.,* 2013).** L'acide lactique diminuant le pH du milieu, l'acétate de sodium est protoné en acide acétique et peut donc agir comme antifongique. L'absence de cet acide dans les surnageants de culture en MRS sans acétate de sodium entraine donc la perte d'activité contre *C. intermedia* 3669. De plus, cela conduit à une baisse de la production d'acide lactique probablement à cause de l'absence de son pouvoir tampon qui ne ralentit pas la baisse de pH lors du développement des bactéries.

4. Recherche d'acides organiques minoritaires en MRS-Glc et MRS-Lac

Sur l'ensemble des surnageants de culture testés contre la croissance de *C. intermedia* 3669, tous ont montré une perte d'activité totale lors de l'augmentation de la valeur du pH à 5. Ces résultats suggéraient l'action d'acide(s) organique(s) contre la levure cible. L'acide lactique et l'acide acétique sont les deux acides antifongiques les plus souvent décrits dans la littérature **(Narendranath *et al.,* 2001, Pelàez *et al*., 2011, Quattrini *et al.,* 2018)**. Un lien entre leur concentration dans les surnageants de culture et l'activité de *C. intermedia* 3669 a été mis en évidence mais ne permet pas d'expliquer la totalité de l'activité observée, notamment pour le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 (*L. spicheri* 6187). La présence d'autres molécules, agissant probablement en synergie avec l'acide lactique et/ou acétique, est donc supposée.

Les bactéries lactiques, et notamment les lactobacilles, sont décrites pour produire d'autres acides organiques possédant des activités antifongiques tels que l'acide phényllactique, l'acide benzoïque, … (**Crowley *et al.,* 2013, Siedler *et al.,* 2019)**. En 2012, Brosnan et son équipe ont proposé une méthode analytique d'extraction en phase liquide puis d'analyse en LC-MS permettant la détection puis le dosage de 25 composés antifongiques connus. Ce protocole a par la suite été ré-optimisé sur 15 acides organiques possédant un noyau phényl **(Brosnan *et al.,* 2014)**. Ainsi, cette méthode a été appliquée aux surnageants de notre étude. La détection et le dosage de 15 composés antifongiques décrits dans cette méthode ont été réalisés sur les surnageants issus des milieux MRS-Glc et MRS-Lac.

Dans un premier temps, le temps de rétention puis les droites de calibration (relation entre l'aire obtenue (mA/min) et la concentration) ont été déterminés pour chacune de ces molécules pour des concentrations comprise entre 1 et 50 mg/L. Le récapitulatif de cette mise au point est présenté en tableau 13. Par la suite, les rendements d'extraction ont été évalués sur du milieu MRS supplémenté à 10 mg/L avec chacune de ces 15 molécules (tableau 14).

Tableau 13 : Calibration du dosage en LC-MS de 15 molécules antifongiques (Adapté de **Brosnan *et al.*, 2012**)

Molécules	**Formule chimique**	**m/z**	**Temps de rétention (min)**	**Gamme de linéarité (mg/L)**	**Equation**	**R^2**
Acide DL-p- hydroxyphényllactique	C9H10O4	181,1	2,2	1-20	Y = 170,5*X + 191,8	0,9888
Acide 4-hydroxybenzoïque	C7H6O3	137,0	2,5	1-25	Y = 87,00*X + 69,48	0,9972
acide 3,4 dihydroxyhydrocinnamique	C9H10O4	181,1	3,1	5-25	Y = 113,6*X + 439,6	0,9913
Acide vanillique	C8H8O4	167,0	3,2	1-25	Y = 1,109*X + 2,196	0,9912
Acide caféique	C9H8O4	179,0	3,3	1-25	Y = 187,6*X + 256,6	0,9921
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	C6H12O3	131,1	3,7	5-25	Y = 228,0*X + 809,2	0,9909
Acide 3-(4-hydroxyphenyl) propionique	C9H10O3	165,1	4,3	1-25	Y = 8,244*X - 2,192	0,9968
Acide p-couramique	C8H8O3	163,0	4,3	1-25	Y = 145,3*X + 194,5	0,9924
Acide phényllactique	C9H10O3	165,1	4,5	1-25	Y = 200,5*X + 199,7	0,9943
Acide férulique	C10H10O4	193,1	4,9	1-50	Y = 24,40*X + 18,99	0,9978
Acide benzoïque	C7H6O2	121,0	5,6	5-50	Y = 0,8959*X - 2,128	0,9964
Acide salicylique	C7H6O3	137,0	6,1	5-25	Y = 168,7*X + 382,2	0,9978
Acide hydrocinnamique	C9H10O2	149,1	7,4	1-25	Y = 2,528*X - 2,542	0,9969
Acide azélaïque	C9H16O4	187,1	7,9	5-50	Y = 383,4*X -488,67	0,9945
Acide méthylcinnamique	C10H10O2	161,1	9,6	1-50	Y = 1,624*X - 17,41	0,9965

Tableau 14 : Rendement d'extraction en milieu MRS de 15 molécules antifongiques (exprimé en pourcentage).

Molécules recherchées	Rendement d'extraction (%)		Ecart type
Acide DL-p- hydroxyphénylactique	35,6	+/-	4,7
Acide 4-hydroxybenzoïque	64,8	+/-	12,8
Acide 3,4 dihydroxyhydrocinnamique	48,3	+/-	2,2
Acide vanillique	59,8	+/-	21,1
Acide caféique	81,5	+/-	8,6
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	126,4	+/-	5,2
Acide 3-(4-hydroxyphenyl) propionique	64,8	+/-	8,0
Acide p-couramique	52,4	+/-	10,9
Acide phényllactique	66,4	+/-	9,0
Acide férulique	58,8	+/-	21,2
Acide benzoïque	77,8	+/-	31,4
Acide salicylique	138,3	+/-	39,1
Acide hydrocinnamique	73,2	+/-	30,4
Acide azélaïque	93,6	+/-	1,8
Acide méthylcinnamique	129,7	+/-	46,3

Ainsi, l'ensemble des 15 molécules recherchées peuvent être extraites par méthode QuEChERS en milieu MRS avec des rendements d'extraction compris en moyenne entre 35,6 +/- 4,7 % pour l'acide DL-p- hydroxyphényllactique et 138 +/- 39 % pour l'acide salicylique.

Parmi ces 15 molécules, plusieurs molécules sont retrouvées dans les sunageants des six souches étudiées. Le récapitulatif des molécules produites est présenté dans les annexes de 2 à 7. Les acides phényllactique, DL-p-hydroxyphényllactique et 2-hydroxyisocaproïque sont détectés à différentes concentrations dans tous les surnageants de culture des six souches étudiées (Figure 39A, B et C).

Les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. casei* 6960 produisent en quantités similaires l'acide DL-p-hydroxyphényllactique (entre 5 et 10 mg/L) et l'acide phényllactique (entre 50 et 75 mg/L en moyenne). La souche inactive *L. paracasei* 6363 en produit en faible quantité (1 mg/L d'acide DL-p-hydroxyphényllactique et 7,7 mg/L d'acide phényllactique) tandis que la souche *L. zymae* 6188 en produit plus que les autres souches actives (85 mg/L et 140 mg/L en moyenne, respectivement).

Les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 produisent en quantités similaires l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (entre 100 et 130 mg/L). La souche *L. spicheri* 6187 en produit deux fois moins (50 mg/L) et les souches *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960 en quantité très faible (1 mg/L et 20 mg/L respectivement).

La production d'acide DL-p-hydroxyphényllactique et d'acide phényllactique n'est pas significativement différente entre MRS-glucose et MRS-lactose pour chacune des six souches (Test de Student, p-values > 0.05).

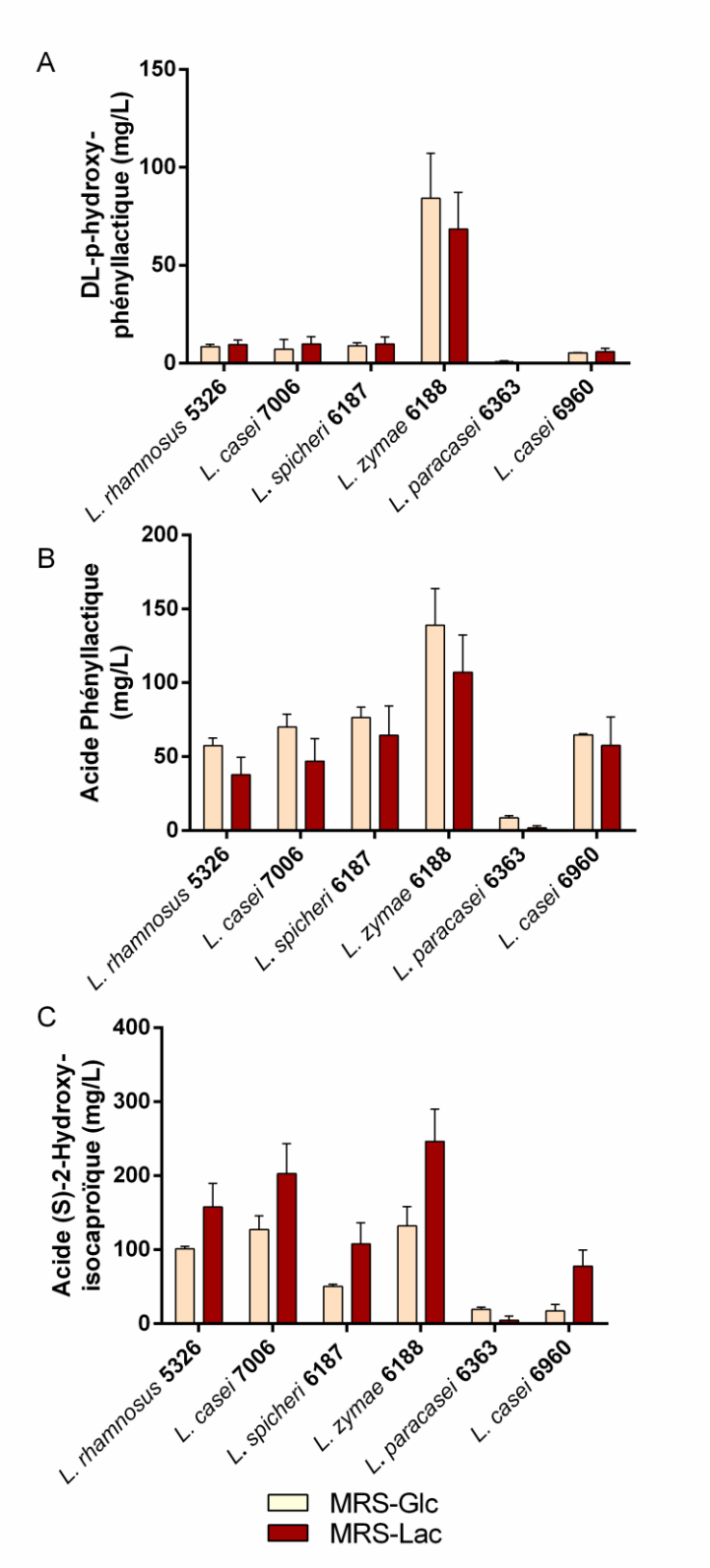


Figure 39 : Concentrations d'acide DL-p-hydroxyphényllactique (A), d'acide phényllactique (B) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (C) dosés en LC-MS dans les surnageants de lactobacilles en fin de culture (n=3).

5. Surproduction d'acide phényllactique et d'(S)-2-hydroxyisocaproïque en MRS-Glc

Le catabolisme des acides aminés est une source importante d'acides carboxyliques sécrétés par les lactobacilles. La phénylalanine est décrite comme un précurseur de l'acide phényllactique **(Chaudhari, 2016)** tandis que la leucine est décrite comme un précurseur de l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque **(Smit *et al.*, 2004)**. Une étude publiée en 2018 a démontré que l'ajout de phénylalanine dans le milieu MRS conduisait à la surproduction d'acide phényllactique par la souche *Lactobacillus reuteri* R29 et donc à l'augmentation de l'activité antifongique **(Schmidt *et al.*, 2018)**.

a. Surproduction chez la souche *L. casei* 7006

Parmi les ferments de biopréservation de notre étude, la souche *L. casei* 7006 apparait comme l'une des souches les plus actives contre le genre *Candida*. De plus, cette souche produit de l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque, l'acide DL-p-hydroxy-phényllactique et de l'acide phényllactique en milieu MRS (Figure 39). Ainsi, phénylalanine et leucine ont été ajoutées à 2 et 20 g/L au milieu de culture MRS afin d'évaluer l'effet de l'augmentation de la quantité de ces acides sur son activité antifongique. Le dosage des acides carboxyliques retrouvés dans ces milieux dopés est présenté en Figure 40.

L'ajout de ces précurseurs n'a pas d'influence significative sur le taux d'acide lactique produit, retrouvé à une moyenne de 22 g/L dans chaque milieu après 24h de croissance (Figure 40). En ce qui concerne l'acide DL-p-hydroxyphényllactique, celui-ci est retrouvé dans des concentrations moyennes de 3,5 mg/L en milieu MRS. La production de cet acide dans un milieu MRS + Phe 2 g/L est inférieure au MRS avec 1 mg/L. Lorsque le taux de phénylalanine augmente à 20 g/L, l'acide DL-p-hydroxyphényllactique est encore moins produit avec une concentration inférieure à 1 mg/L dans l'extrait concentré 10 fois. L'ajout de Leu à 2 g/L n'engendre pas de différence significative de production de cet acide (Test de Student, p-value = 0.1684). Un ajout de 20 g/L entraine une baisse de la production à un niveau inférieur à 0,1 mg/L.

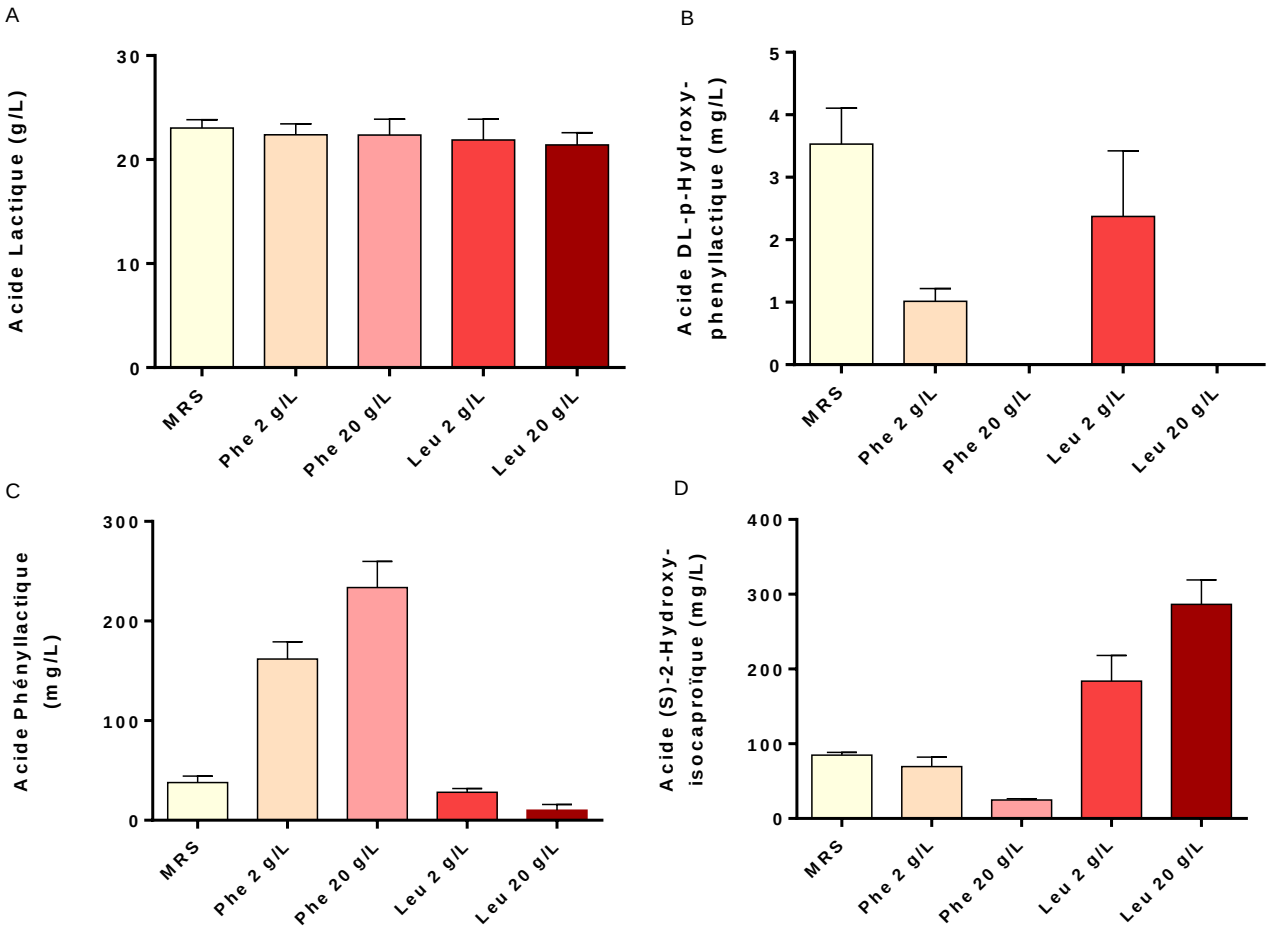


Figure 40 : Concentrations d'acide lactique, dosé en HPLC (A), d'acide DL-p-hydroxy-phényllactique (B), d'acide phényllactique (C) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproique (D) dosés en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. casei* 7006 cultivée en milieu MRS supplémenté ou non avec 2 ou 20 g/L de phénylalanine (Phe) ou de leucine (Leu) (n=3).

En milieu MRS, la souche *L. casei* 7006 produit en moyenne 37,8 µg/mL d'acide phényllactique. L'ajout de phénylalanine dans le milieu de culture MRS a pour effet d'augmenter la production d'acide phényllactique d'un facteur 4 pour un ajout à 2 g/L (162 mg/L en moyenne) et d'un facteur 6 pour un ajout de 20 g/L (233,7 mg/L en moyenne). Ces résultats sont en accord avec la publication de Schmidt et son équipe en 2018 qui ont retrouvé une production passant de 38,1 mg/L à 113,2 mg/L avec la souche *L. reuteri* R29.

En milieu MRS, la souche *L. casei* 7006 produit en moyenne 85 µg/mL d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque. Un ajout de phénylalanine à 2 g/L n'influe pas sur la production d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque mais un ajout à 20 g/L la diminue

significativement (24,8 mg/L). Un ajout de leucine dans le milieu MRS entraine une augmentation de la production de cet acide avec en moyenne de 183,7 mg/L à 2 g/L et en moyenne de 286,7 mg/L à 20 g/L. L'ajout de leucine n'influe pas sur la production d'acide phényllactique à 2 g/L. En revanche, on observe une différence à 20 g/L de leucine ajoutée, la quantité d'acide phényllactique détectée diminuant significativement (Test de Student, p-value = 0,0054).

Pour déterminer si les surnageants de culture issus d'une supplémentation en acides aminés ont une activité supérieure à celle d'une culture en MRS seul, plusieurs tests ont été réalisés sur *C. intermedia* 3669. Afin de distinguer d'éventuelles faibles variations d'activité pouvant être masquées par un excès de surnageant par rapport à la cible, des volumes variables de surnageant (60, 80 et 100 µL) ont été mis en contact avec la cible (100 µL) (Figure 40).

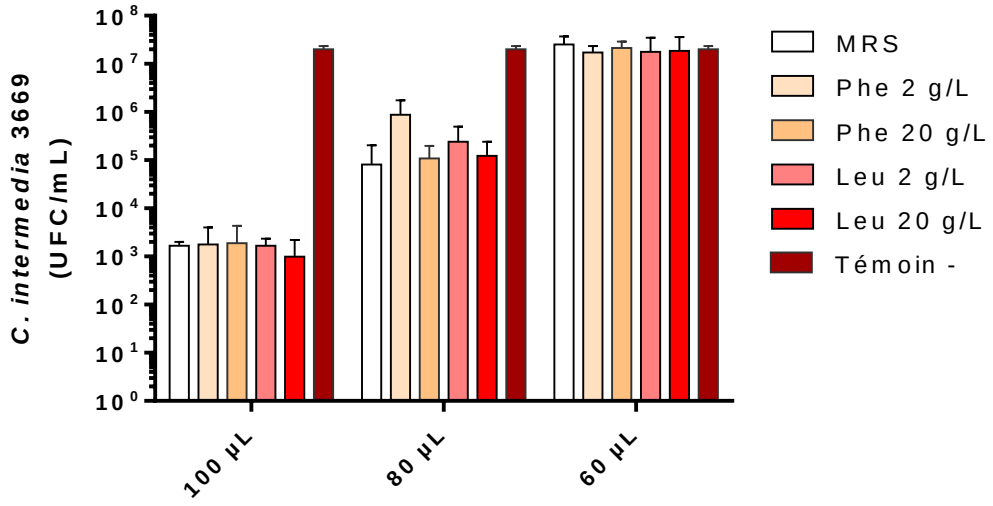


Figure 41 : Croissance de *C. intermedia* 3669 exprimée en UFC/mL après 24h à 25°C en présence de différents volumes de surnageants de la souche *L. casei* 7006 cultivée en MRS supplémenté ou non en phénylalanine ou leucine (n=3).

En l'absence de surnageant de culture de la souche *L. casei* 7006, la croissance de la souche *C. intermedia* 3669 est en moyenne de 2.10^7 UFC/mL. Avec un ratio de 1:1 (v/v), soit 100 µL de surnageant issu d'un milieu supplémenté ou non, la croissance de la souche *C. intermedia* 3669 est inhibée avec une croissance en

moyenne de 10^3 UFC/mL. Si le volume de ces surnageants est diminué à 80 µL lors des tests d'activité, la croissance de *C. intermedia* 3669 est en moyenne de 10^5 UFC/mL. Il n'y a pas de différence significative de l'activité entre un surnageant issus d'un milieu MRS supplémenté ou non en acides aminés Leucine ou Phénylalanine (Test de Student, p-value > 0,05). Enfin, avec 60 µL de surnageant, on constate une croissance de *C. intermedia* 3669 identique à celle en présence de tampon citrate pH 4,3 (témoin négatif) avec en moyenne de 2.10^7 UFC/mL. Il n'y a donc pas d'activité pour ces surnageants à ce volume ajouté.

L'ajout de phénylalanine et de leucine dans le milieu MRS induit la surproduction d'acide phényllactique et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque chez la souche *L. casei* 7006. Cependant, malgré cette augmentation, l'activité des surnageants contre la croissance de *C. intermedia* 3669 n'augmente pas (Figure 41). L'augmentation seule de chacun de ces deux acides en milieu MRS ne suffit donc pas à accroître l'activité antifongique du surnageant de la souche *L. casei* 7006.

b. Surproduction chez la souche *L. paracasei* 6363

La souche *L. paracasei* 6363 ne présente pas d'activité antifongique sur milieu gélosé. Le surnageant de cette souche cultivée en MRS possède une faible activité contre *C. intermedia* 3669 en réduisant la croissance moyenne de 2.10^7 à $4{,}5.10^5$ UFC/mL. Le surnageant de cette souche possède le même taux d'acide lactique que la souche *L. spicheri* 6187 : 16 et 15 g/L respectivement. Cependant, le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 est plus actif d'un log contre la croissance de *C. intermedia* 3669 avec en moyenne une population finale de $1{,}6.10^4$ UFC/mL (Figure 30). Ces résultats suggéraient la présence de molécules actives autres que l'acide lactique dans le surnageant de la souche *L. spicheri* 6187 par rapport à celui de la souche *L. paracasei* 6363. L'analyse par QuEChERS d'autres acides carboxyliques produits a ainsi mis en évidence une production inférieure des acides (S)-2-hydroxyisocaproïque, DL-p-hydroxyphényllactique et phényllactique par la souche inactive (Figure 39). Ainsi, afin de vérifier leur éventuelle implication dans l'activité antifongique, la surproduction de l'acide phényllactique et l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque par ajout de 0,2 % de leucine et de 0,2 % de phénylalanine a été recherchée dans une culture de la souche *L. paracasei* 6363 pour tenter d'induire une activité dans un surnageant sans cela inactif (Figure 42).

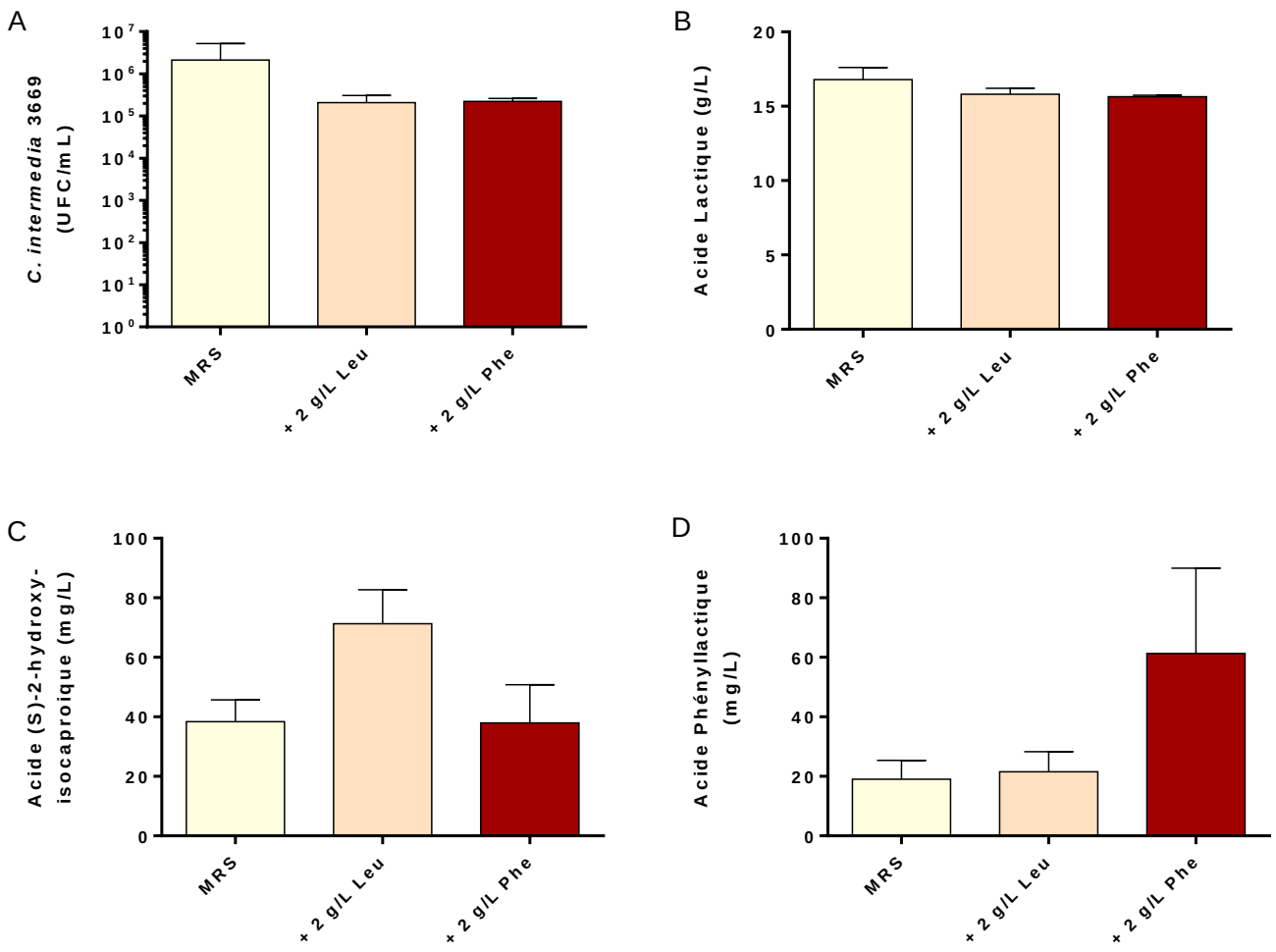


Figure 42 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures de la souche *L. paracasei* 6363 en MRS supplémenté ou non avec 2 g/L de phénylalanine (Phe) et de leucine (Leu) (A). Concentrations d'acide lactique dosé en HPLC (B), d'acide (S)-2-hydroxyisocaproique (C) et d'acide phényllactique (D) dosés en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. paracasei* 6363 en MRS supplémenté ou non (n=3).

L'ajout de phénylalanine ou de leucine à 2 g/L n'influe pas significativement sur l'activité de la souche *L. paracasei* 6363 (Test de student, p-values = 0,3911 et 0,3832 respectivement). Comme pour la souche *L. casei* 7006, l'ajout de leucine ou de phénylalanine n'influence pas la production d'acide lactique dans le surnageant de culture de la souche *L. paracasei* 6363 avec une moyenne de 16 g/L. Un ajout de

20 g/L de phénylalanine et de leucine devra être effectuée pour confirmer ou non cette tendance.

Un ajout de 2 g/L de phénylalanine induit une augmentation de la production d'acide phényllactique de 19,1 µg/mL à 61,3 µg/mL chez la souche *L. paracasei* 6363. Cette production est supérieure à celle obtenu avec la souche *L. casei* 7006 (de 46,8 µg/mL en milieu MRS-Glc) mais non significativement différente de celle de la souche *L. spicheri* 6187 (en moyenne de 70,1 mg/L en milieu MRS-Glc) (Test de student, p-value = 0,4270).

Un ajout de 2 g/L de leucine induit une augmentation de la production d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque de 38,4 mg/L à 71,3 mg/L chez la souche *L. paracasei* 6363. Cette production est supérieure à celle obtenue avec la souche *L. spicheri* 6187 à 50,5 mg/L en moyenne en MRS-Glc (Test de student, p-value = 0,0387). Elle ne permet toutefois pas d'augmenter l'activité du surnageant de la souche *L. paracasei* 6363. Cet acide n'est donc pas seul responsable de l'activité antifongique chez la souche *L. spicheri* 6187. Il est cependant important de noter la faible teneur en acide phényllactique lors d'une surproduction de l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque par ajout de 2 g/L de leucine. De nouveaux tests d'ajout de phénylalanine et de leucine à des concentrations plus élevées devront être réalisés avec la souche *L. paracasei* 6363.

D. Caractérisation et activité des souches en milieu lait

Le lait est un milieu complexe contenant du lactose, des sels, organiques ou non, des vitamines, des lipides, et des protéines dont la majorité correspond à des caséines. Les molécules antifongiques produites par les LAB sont issues du métabolisme et dépendent donc de la composition du milieu. Ainsi, la production de molécules antifongiques à partir des nutriments d'un milieu MRS-Lac et de lait a été comparée pour chacune des six souches de lactobacilles.

1. Population finale

La population des six souches de lactobacilles a été déterminée après 72 h de culture en milieu lait et comparé aux valeurs obtenues en MRS-Lac (Figure 43). La biomasse des souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. paracasei* 6363 n'est pas significativement différente dans les deux milieux (Test de Student, p-values > 0.05). En ce qui concerne les souches *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188, leur croissance en milieu lait est inférieure à celle en milieu MRS-lactose (Test de Student, p-values < 0.05) : de 10^7 à 10^9 UFC/mL pour la souche *L. casei* 6960, et de 10^8 à 10^9 UFC/mL pour les souches *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188.

Le surnageant de culture correspond ici au « petit lait » obtenu après coagulation du lait avec les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 puis filtré sur membrane 0,22 µm. Pour les souches *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960 et *L. spicheri* 6187, le pH final en milieu lait ne descend qu'à 5,2, n'entraînant pas la coagulation, le lait entier a donc lui aussi été filtré sur membrane 0,22 µm. Les pH des surnageants en milieu lait pour les six souches de lactobacilles sont significativement différents de ceux obtenus avec le milieu MRS-lac. Pour les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. paracasei* 6363 et *L. casei* 7006, le pH final en milieu lait est inférieur à celui du MRS-lactose : 3,7, 5,6 et 3,5 en moyenne respectivement. A l'inverse, le pH final pour les surnageants des souches *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 est supérieur en milieu lait, comparativement au MRS lactose avec des valeurs moyennes de : 5,4, 5,2 et 4,5 respectivement. Ceci peut s'expliquer par la plus faible croissance de ces souches.

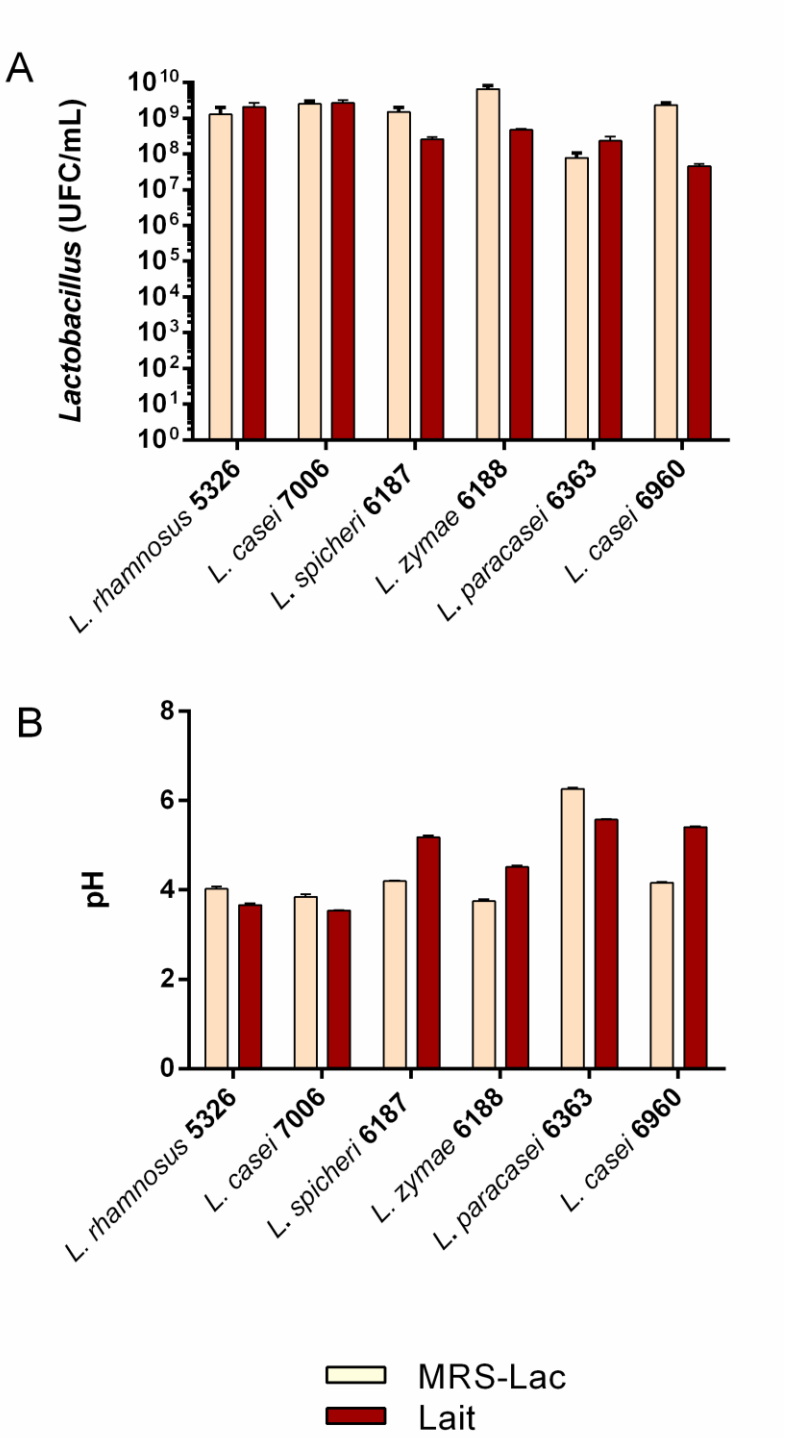


Figure 43 : Population finale de six souches de lactobacilles en UFC/mL (A) et pH final (B) après 24h de croissance en milieu MRS-Lac ou 72h en milieu lait (n=3).

2. Activité antifongique

Comme pour les surnageant issus d'un milieu MRS, des tests d'activité contre la croissance de *C. intermedia* 3669 ont été réalisés et sont présentés en Figure 44. L'activité des surnageants issus d'un milieu lait est très affectée par rapport à ceux issus d'un milieu MRS-lac. En effet, pour l'ensemble des surnageants des six souches de lactobacilles, la croissance de *C. intermedia* 3669 n'est pas significativement différente (en moyenne 2.10^7 UFC/mL) avec un surnageant de lactobacilles ou avec un tampon citrate à pH 4,2. Une différence de croissance de la levure cible de 4 log est donc constatée entre les surnageants issus d'un milieu MRS-Lac et d'un milieu lait pour les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 (surnageants les plus actifs).

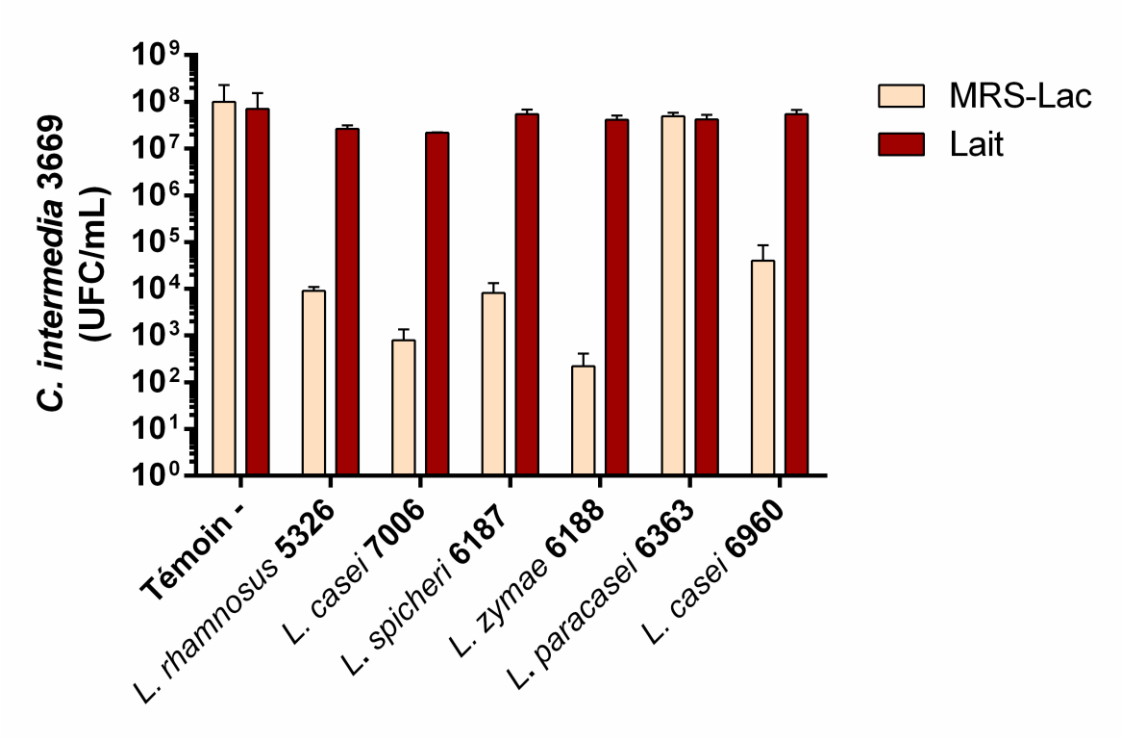


Figure 44 : Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures de lactobacilles en milieu MRS-Lac ou en milieu lait (n=3).

Pour comprendre l'absence d'activité de ces surnageants, une quantification des taux d'acides lactique et acétique a été réalisée par HPLC (Figure 45).

3. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC

Les quantités d'acide lactique et d'acide acétique ont été déterminées dans la fraction soluble filtrée du milieu lait (Figure 45). Par rapport au MRS-Lac, la production d'acide lactique et diminue en milieu lait pour les souches *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 avec en moyenne : 2,4, 1,9, 2,5 et 6,6 g/L respectivement. En revanche, pour les surnageants des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 (surnageants actifs en milieu MRS-Lac), le taux d'acide lactique retrouvé n'est pas significativement différent du surnageant en MRS-lactose avec en moyenne : 16 g/L et 18 g/L respectivement (Test de student, p-values = 0,9386 et 0,8587). Malgré une valeur de pH inférieure pour la souche *L. paracasei* 6363 en milieu lait par rapport au MRS-lactose, la production d'acide lactique est inférieure (de 4,7 à 2,4 g/L en milieu lait). Ces résultats sont en accord avec le fait que cette souche se développe moins en présence de lactose (Figure 43A). En ce qui concerne l'acide acétique, il n'est détecté dans aucun des surnageants issus d'un milieu lait, excepté celui de la souche *L. spicheri* 6187, où il est retrouvé à une concentration de 9 g/L.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la baisse d'activité des surnageants issus d'un milieu lait. La première, et la plus vraisemblable, est que l'acide lactique n'est pas seul responsable de l'activité contre *C. intermedia* 3669 et que des composés agissant en synergie avec lui ne sont pas (ou peu) produits en milieu lait. La deuxième hypothèse serait que le ratio acide lactique/lactate présent en milieu lait est différent de celui obtenu en MRS-lac. En effet, la forme acide (plus hydrophobe) est la seule capable de traverser les membranes et de se dissocier à l'intérieur des cellules, acidifiant le cytoplasme en libérant ainsi un proton H^+ et causant la mort des cellules **(Christieans *et al.*, 2013)**. Ainsi, s'il y a plus de lactate que d'acide lactique, l'activité du surnageant s'en trouvera diminuée.

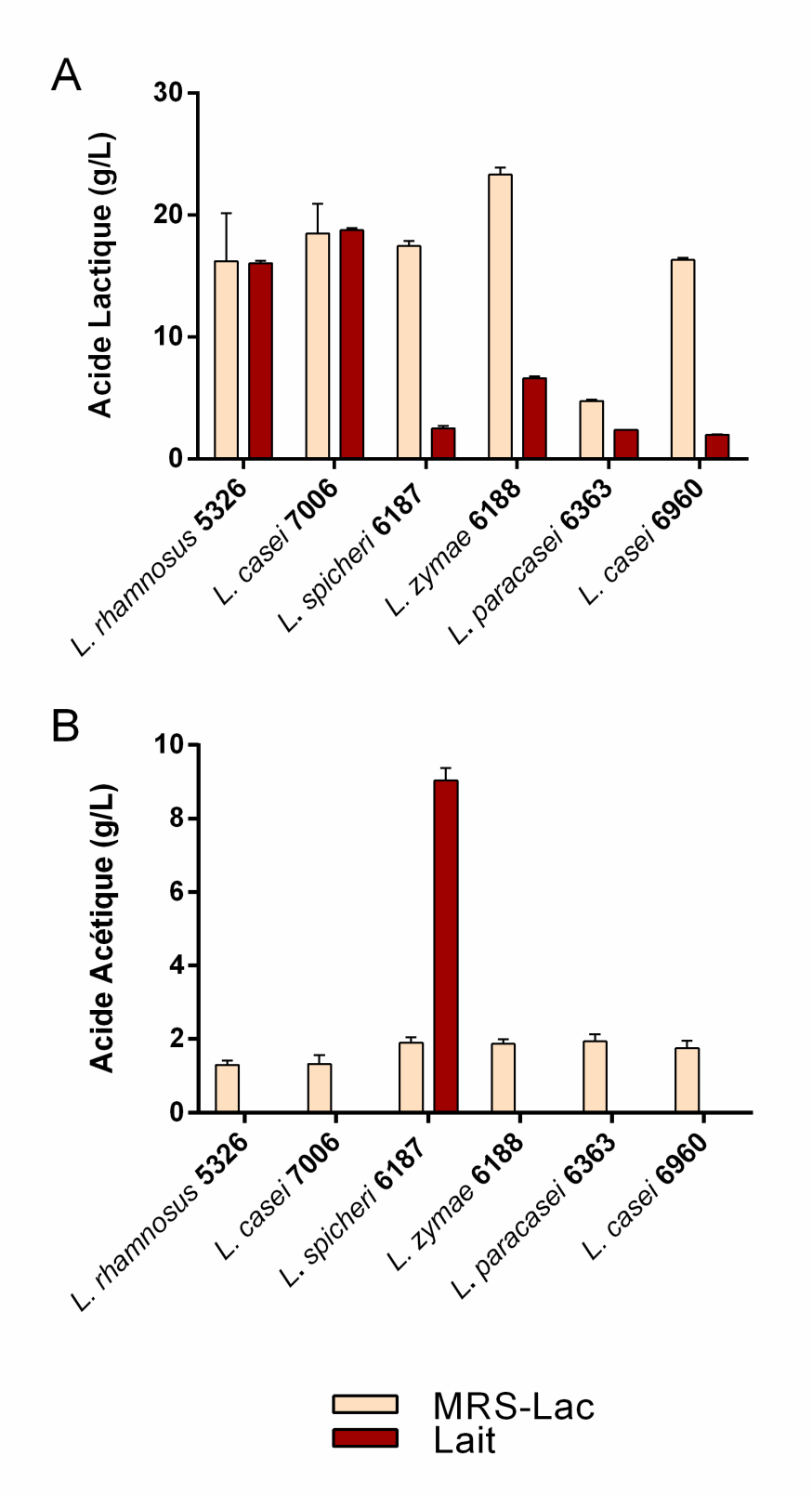


Figure 45 : Concentrations en acide lactique (A) et acide acétique (B) en g/L retrouvées dans les surnageants de culture des six souches de lactobacilles en milieu MRS-Lac après 24h de croissance et en lait après 72h de croissance (n=3).

Cependant, le pH en milieu lait est légèrement inférieur à celui retrouvé en milieu MRS (3,9 et 3,8 contre 3,7 et 3,5 en milieu lait pour les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006. Il devrait donc y avoir plus d'acide lactique que de lactate en milieu lait ce qui invalide cette hypothèse. La troisième hypothèse serait que certaines molécules de la matrice lactée interagissent avec les composés antimicrobiens produits par les lactobacilles, entrainant un effet "barrière". Cela entrainerait donc une diminution de leur concentration sous une forme disponible pour exercer leur activité inhibitrice. Par exemple, le lait est riche en matière grasse : de 35 à 40 g/L, principalement des triglycérides (98%) **(Site de la FAO)**. Les acides carboxyliques mis en évidence dans cette étude, étant eux-mêmes en partie hydrophobes, peuvent donc potentiellement interagir avec ces molécules et donc ne plus être « disponibles » dans le milieu.

L'acide acétique agit comme l'acide lactique en neutralisant le gradient électrochimique de protons. En raison de son pKa plus élevé (4,8 contre 3,9), il est plus efficace que l'acide lactique puisque la forme protonée est présente en plus forte proportion aux pH des surnageants obtenus **(Christieans *et al.*, 2013).** En milieu lait, la production d'acide acétique n'est pas détectée pour cinq des souches de lactobacilles. Une absence de synergie entre l'acide lactique et l'acide acétique pourrait expliquer, en partie, l'absence d'activité des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006. A l'inverse, la souche *L. spicheri* 6187 produit de l'acide acétique en milieu lait en quantité supérieure au milieu MRS-lactose : de 3,2 g/L à 9 g/L mais ne présente pas d'activité. Cependant, le pH de ce surnageant est de 5,18, valeur supérieure au pKa de cette molécule qui est donc majoritairement présente sous forme d'acétate.

4. Recherche d'acides organiques minoritaires

La recherche d'autres acides carboxyliques dans le surnageant lait a été réalisée afin d'identifier d'éventuelles molécules antifongiques différemment produites en milieu lait par rapport au milieu MRS-Lac. Comme en milieu MRS-Glc, le rendement d'extraction des 15 molécules antifongiques a été déterminé par dopage du lait à 10 mg/L avec chacune d'elles (Tableau 15).

Tableau 15 : Rendement d'extraction en milieu lait de 15 molécules antifongiques connues

Molécules recherchées	Rendement d'extraction (%)		Ecart type
Acide DL-p- hydroxyphenyllactique	78,8	+/-	2,3
Acide 4-hydroxybenzoïque	87,8	+/-	2,2
Acide 3,4 Dihydroxyhydrocinnamique	53,3	+/-	2,3
Acide vanillique	53,9	+/-	0,7
Acide caféique	60,8	+/-	0,4
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	81,0	+/-	0,3
Acide 3-(4-hydroxyphényl) propionique	98,3	+/-	1,5
Acide p-couramique	78,0	+/-	0,2
Acide phényllactique	100,5	+/-	1,4
Acide férulique	81,6	+/-	1,0
Acide benzoïque	61,1	+/-	0,6
Acide salicylique	83,9	+/-	0,8
Acide hydrocinnamique	53,7	+/-	0,8
Acide azélaïque	71,2	+/-	3,6
Acide méthylcinnamique	50,0	+/-	2,9

Les 15 molécules en LC-MS. Leur rendement d'extraction est compris en moyenne entre 50% pour l'acide méthylcinnamique et 100,5% pour l'acide phényllactique. Ainsi cette approche permet d'identifier et de quantifier la quantité des 15 molécules recherchées dans les surnageants des lactobacilles sélectionnés. Les acides (S)-2-hydroxyisocaproïque, DL-p-hydroxyphényllactique et phényllactique ont ainsi été détectés puis dosés en LC-MS (Figure 46).

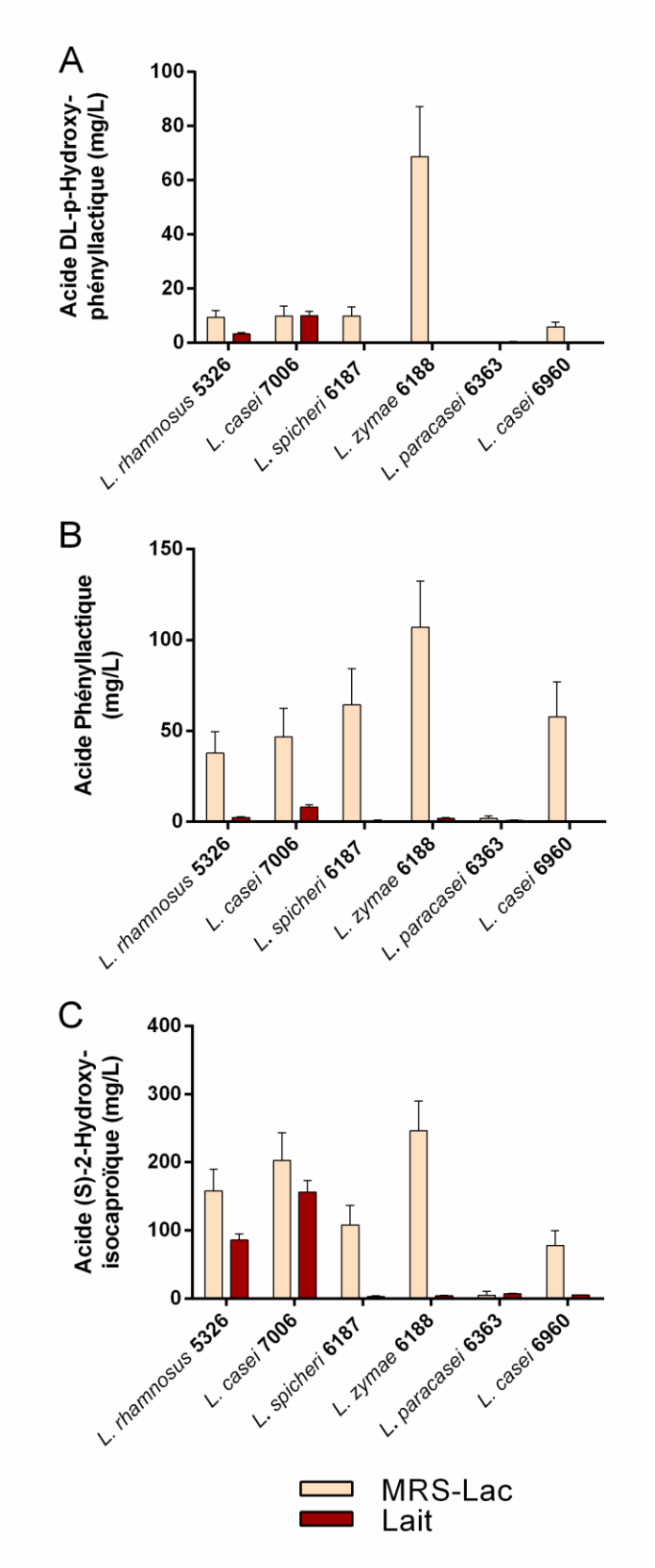


Figure 46 : Concentrations d'acide DL-p-hydroxyphényllactique (A), d'acide phényllactique (B) et d'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque (C) dosés en LC-MS dans les surnageants de *Lactobacillus* après 24h de culture en milieu MRS-Lac ou 72h en milieu lait (n=3).

L'acide DL-p-hydroxyphénylactique est détecté seulement à l'état de trace (< 0,1 mg/L) dans les surnageants issus de milieu lait pour les souches *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188. Le surnageant en milieu lait de la souche *L. rhamnosus* 5326 contient en moyenne seulement 3,3 mg/L contre 9,4 mg/L en MRS-Lac. Le surnageant de la souche *L. casei* 7006 ne présente pas de différence de concentration d'acide DL-p-hydroxyphénylactique entre les milieux MRS-Lac et lait, avec en moyenne 10 mg/L.

L'acide phénylactique est détecté dans chaque surnageant en milieu lait, cependant la concentration de cet acide est faible et proche de la limite de détection. Pour les surnageants des souches *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960 et *L. spicheri* 6187*,* la concentration moyenne est inférieure à 1 mg/L (0,9, 0,3 et 0,6 µg/mL respectivement). Pour la souche inactive *L. paracasei* 6363, il n'y a pas de différence significative avec le milieu MRS-Lac puisque cette souche en produisait seulement 1,8 mg/L. Pour les souches *L. casei* 6960 et *L. spicheri* 6187, cette production diminue par rapport au surnageant en milieu MRS-Lac qui en contenait en moyenne 57,7 et 64,4 mg/L respectivement. En ce qui concerne les souches actives *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. zymae* 6188 seulement 2,5, 12,7 et 1,9 mg/L sont produits respectivement contre 37,7, 46,7 et 107,1 mg/L en milieu MRS-Lac. Cela pourrait être expliqué par une plus faible disponibilité de la phénylalanine dans le milieu lait.

L'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque est également détecté dans l'ensemble des surnageants issus d'un milieu lait. Pour ceux des souches *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188, sa concentration est inférieure à 10 mg/L avec respectivement : 6,9, 5,2, 2,9 et 4,1 mg/L en moyenne. Pour la souche *L. paracasei* 6363, la production de cet acide n'est pas significativement différente de celle en milieu MRS-Lac avec 4,8 mg/L en moyenne. Comme pour les acides DL-p-hydroxyphénylactique et phénylactique, la concentration de l'acide (S)-2-hydroxyisocaproïque est inférieure à celle obtenue en MRS-Lac pour les surnageants des souches *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 dans lesquels elle atteint en moyenne 77,8, 141 et 246,3 mg/L respectivement. La concentration de cet acide reste élevée dans les surnageants en milieu lait des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 avec 85,8 et 156,4 mg/L respectivement. Cependant, pour la

souche *L. rhamnosus* 5326, cette production est environ deux fois inférieure à celle obtenue en MRS-Lac (157,8 mg/L). En revanche pour *L. casei* 7006, même si la quantité moyenne de l'acide (S)-2-hydroxyisocaproique en MRS-Lac est plus élevée avec 202,8 mg/L, cette différence n'est pas significative par rapport au milieu lait (Test de Student, p-value = 0,1412).

Les surnageants de la souche *L. casei* 7006 en milieux MRS-Lac et lait ne présente pas de différences significatives entre leurs concentrations d'acide lactique, d'acide DL-p-hydroxyphénylactique, et (S)-2-hydroxyisocaproique. Cependant, seul le surnageant obtenu en MRS-Lac inhibe *C. intermedia* 3669. Deux molécules antifongiques ont une concentration significativement différente entre ces deux surnageants : l'acide acétique et l'acide phényllactique.

En ce qui concerne l'acide acétique, la concentration détectée pour le surnageant de la souche *L. casei* 7006 en milieu MRS correspond à l'acétate de sodium initialement présent dans ce milieu et non consommé lors de la croissance des *Lactobacillus*. Si ce composé est éliminé de ce milieu, la souche *L. casei* 7006 produit environ deux fois moins d'acide lactique dans son surnageant (23 contre 13,5 g/L en moyenne) (Figure 45) qui devient inactif contre la souche *C. intermedia* 3669. En milieu lait, la présence d'acide acétique n'est pas détectée dans le surnageant de culture et pourrait être impliquée dans l'activité détectée en MRS.

5. Surproduction d'acide phényllactique et (S)-2-hydroxyisocaproique en lait

L'acide phényllactique est détecté dans le surnageant de la souche *L. casei* 7006 en milieu lait mais à des concentrations inférieures à celles obtenues en milieu MRS-Lac : 8,2 mg/L contre 46,8 mg/L. Précédemment, nous avons montré que l'ajout de phénylalanine, précurseur de l'acide phényllactique, en MRS entraînait la surproduction de cet acide. C'est pourquoi ce même ajout a été réalisé en milieu lait afin d'évaluer l'augmentation de concentration de cet acide et d'en mesurer l'effet sur l'activité antifongique contre *C. intermedia* 3669 (Figure 47).

Lors d'une culture en milieu lait, 8,2 mg/L d'acide phényllactique sont détectés dans le surnageant de la souche *L. casei* 7006. Lorsque la phénylalanine est

ajoutée à 0,2 % au milieu de culture, ce taux augmente fortement avec 146,9 mg/L (Figure 47A) produits en moyenne. Il est supérieur à celui retrouvé dans un surnageant MRS-Lac à 46,8 mg/L en moyenne. Cependant, malgré l'accroissement de la concentration de cet acide dans le surnageant, l'activité de celui-ci contre *C. intermedia* 3669 n'augmente pas avec une population moyenne de la levure cible de 2.10^7 UFC/mL contre $2{,}2.10^2$ UFC/mL en MRS (Figure 47B).

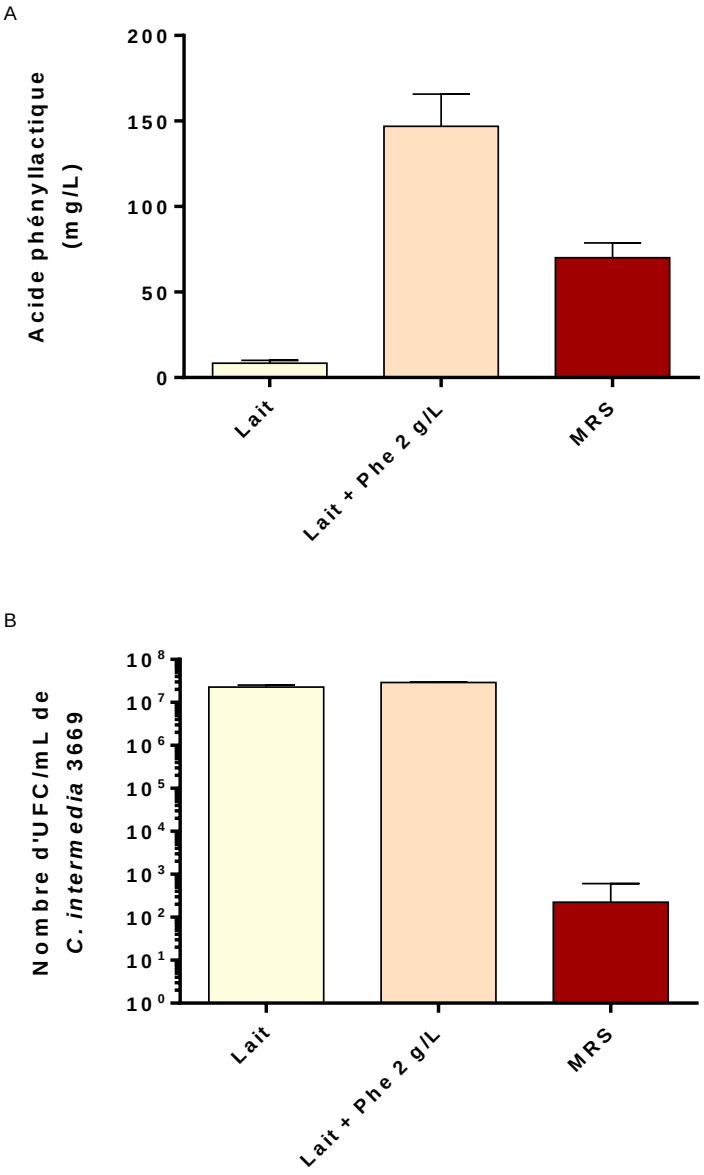


Figure 47 : Concentration en acide phényllactique dosé en LC-MS dans les surnageants de la souche *L. casei* 7006 après 24h de culture en milieu MRS ou 72h en milieu lait avec ou sans ajout de phénylalanine (A).Nombre d'UFC/mL de *C. intermedia* 3669 après 24h de

culture lors des tests d'activité en microplaque en présence des différents surnageants de cultures (MRS, milieu lait avec ou sans ajout de Phe) (B) (n=3).

La production inférieure d'acide phényllactique par la souche *L. casei* 7006 en milieu lait vis-à-vis du milieu MRS n'est donc pas à l'orgine de la perte d'activité en lait. Ces analyses soulignent l'effet potentiel de l'acétate de sodium (acide acétique) du milieu MRS sur l'activité. Pour palier ce problème, de nouveaux essais ont été réalisés pour se rapprocher des conditions d'un produit industriel pour tester le potentiel des souches dans un contexte plus proche de leur application finale. Ainsi des challenge tests ont été réalisés en contaminant une matrice mimant un produit fermenté industriel (lait fermenté).

E - Analyse du potentiel de biopréservation en challenge test

L'étude de l'activité anti-levures de 17 souches de lactobacilles en milieu MRS et sur milieu gélosé a montré l'effet potentiel de quatre souches pour la biopréservation de matrices lactées : *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188. Leur activité à long terme a été évaluée en laits fermentés contre la croissance de *C. lusitaniae* 3668, levure contaminante naturelle des produits laitiers. Cette levure a montré une résistance plus importante que les autres levures sensibles lors du criblage sur boite. Ainsi, son inhibition pourrait potentiellement signifier un spectre d'inhibition large.

Afin de s'approcher au plus près des conditions de production réelles, les laits fermentés ont été réalisés avec un ferment d'acidification. Celui-ci contient une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetylactis,* auquel ont été ajoutés ou non les ferments de biopréservation testés dans cette étude.

L'étude du potentiel de biopréservation des quatre souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 en challenge test a fait l'objet d'un article scientifique soumis dans l' « International journal of food microbiology » (Annexe 1).

1. Croissance des ferments de biopréservation

Dans un premier temps, la croissance et/ou le maintien des souches de lactobacilles dans des laits fermentés a été suivie par dénombrement des UFC/mL contenus dans les produits sur une période de 21 jours (Figure 48). Durant cette période, les deux étapes du procédé sont la fermentation du lait à 22°C pendant 18h suivie d'un stockage à 7°C jusqu'à 21 jours.

A J0, l'inoculation des différentes souches de lactobacilles est réalisée à $1{,}12.10^7$ UFC/mL. Lors de la fermentation du produit à 22°C pendant 18h (J1, Figure 48), la croissance de ces souches est faible : 1 $\log_{10}$UFC/mL en moyenne pour chaque souche. Aucune différence significative n'est constatée sur la croissance des ferments de biopréservation après cette étape de fermentation. De même, la quantité de cellules cultivables dénombrées entre 1, 14 et 21 jours suggère un maintien du nombre d'UFC de ces souches au cours du procédé, avec une légère augmentation pour le lait fermenté contenant la souche *L. casei* 7006 de 0,4 $\log_{10}$UFC/mL lors du stockage à 7°C pendant 21 jours.

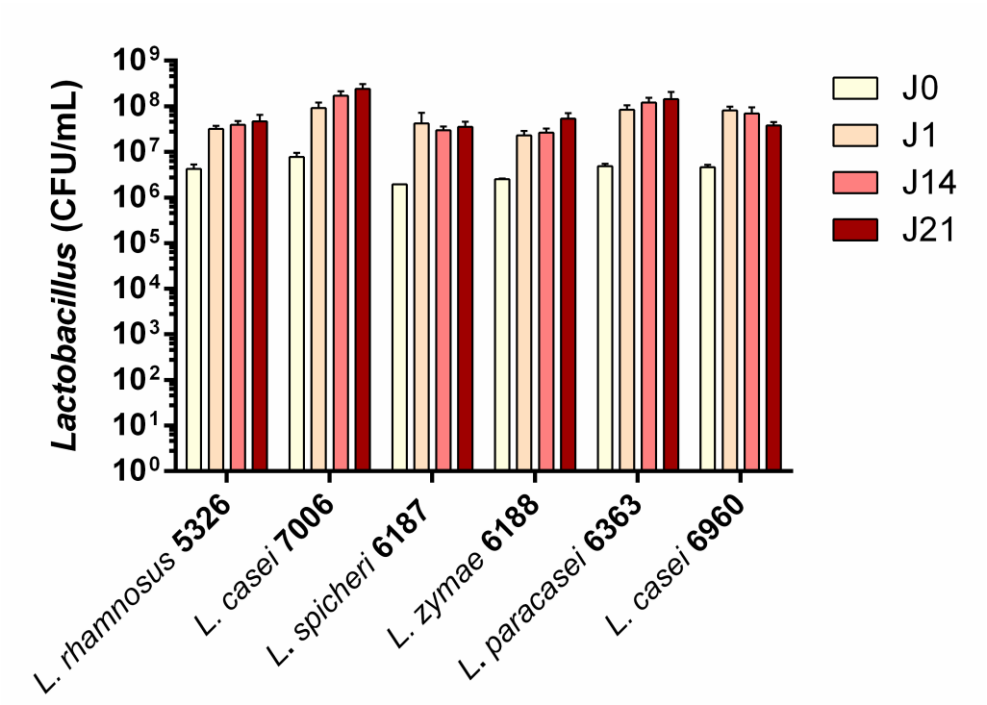


Figure 48 : Nombre d'UFC/mL de lactobacilles contenus dans différents laits fermentés inoculés par ces mêmes souches suivies sur 21 jours à 22°C (J0 et J1) puis à 7°C (J14 et J21).

2. Activité antifongique

L'activité antifongique des ferments de biopréservation en lait fermenté a été déterminée par l'inhibition de croissance de la souche *C. lusitaniae* 3668. Pour cela, une contamination à 15 UFC/mL a été réalisée après l'étape de fermentation, à l'étape J1 du procédé. La croissance du contaminant a été évaluée par dénombrement à 14 et 21 jours (Figure 49).

Au cours du stockage à 7°C, on constate qu'un lait fermenté contaminé qui ne contient pas de ferment de biopréservation, présente une concentration de $2{,}9.10^5$ UFC/mL de *C. lusitaniae* 3668 au bout de 14 jours. Après 21 jours, la population de levure *C. lusitaniae* 3668 atteint $2{,}3.10^7$ UFC/mL, ce qui correspond à une croissance totale de 6 log.

Après 14 jours, la présence des ferments *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 au sein des laits fermentés n'induit pas de différences significatives sur la population de *C. lusitaniae* 3668 : $5{,}5.10^5$, $5{,}3.10^5$, $7.1.10^5$, $7{,}2.10^5$ UFC/mL respectivement. Une croissance plus faible de 0,7 log par rapport au témoin est constatée lors de l'ajout du ferment *L. rhamnosus* 5326 avec une population de $4{,}8.10^4$ UFC/mL. Avec le ferment *L. casei* 7006, la population finale de levure contaminante est à $1{,}9.10^3$ UFC/mL soit un abaissement de 2,17 log.

Après 21 jours, la croissance de la levure contaminante n'est pas significativement différente entre les laits fermentés réalisés avec les ferments *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960 et *L. zymae* 6188 avec respectivement $1{,}1.10^7$, $4{,}9.10^7$ et $5{,}6.10^7$ UFC/mL et ceux réalisés sans lactobacille. Toutefois, une augmentation de croissance d'un log est constatée pour le lait fermenté contenant *L. spicheri* 6187 avec un dénombrement de $3{,}6.10^8$ UFC/mL. A l'inverse, une diminution de 1,3 log est constatée pour le ferment *L. rhamnosus* 5326 avec $2{,}7.10^6$ UFC/mL. La chute de croissance la plus importante de 3,6 log (soit $7{,}6.10^3$ UFC/mL) est retrouvée dans les laits fermentés préparés avec le ferment *L. casei* 7006. L'ajout du ferment de biopréservation *L. casei* 7006, et dans une moindre mesure *L. rhamnosus* 5326, permet donc d'inhiber la croissance de levures contaminantes telle que *C. lusitaniae* 3668. Ces souches possèdent donc, comme montré par les tests en milieu gélosé, un potentiel intéressant de biopréservation en matrice lactée.

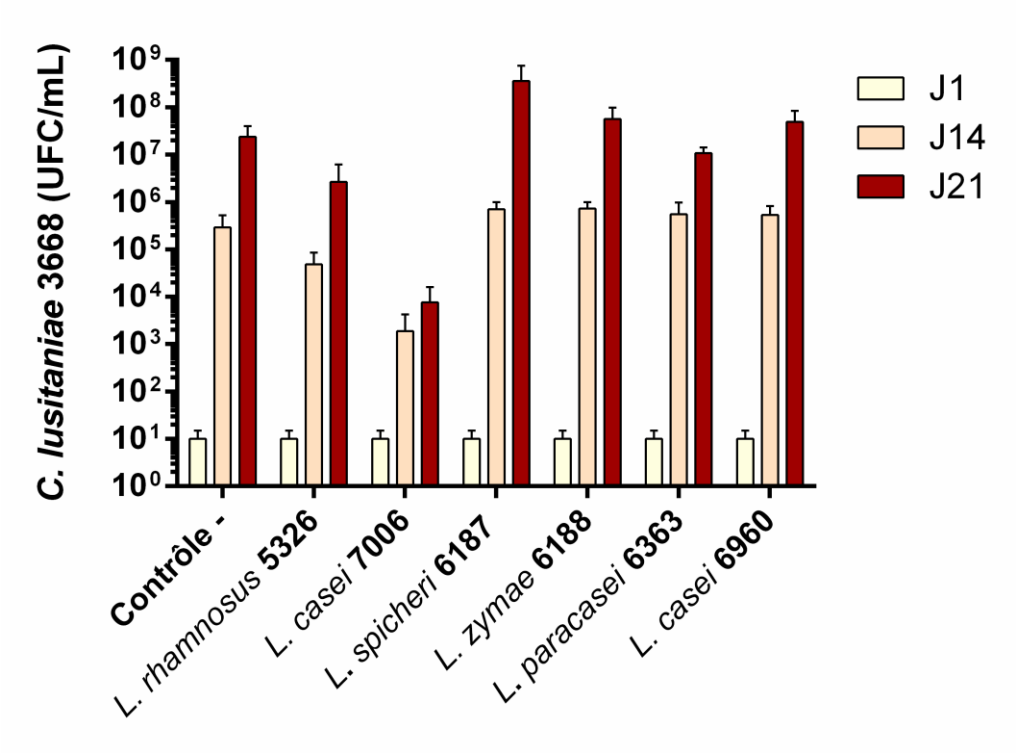


Figure 49 : Nombre d'UFC/mL de *C. lusitaniae* 3668 contenue dans les laits fermentés inoculés ou non par six ferments potentiels de biopréservation suivi sur 21 jours.

3. Dosage des acides organiques majoritaires par HPLC

Afin de caractériser cette activité et d'identifier les molécules antifongiques produites par cette souche, différents dosages des acides organiques produits ont été réalisés par HPLC et LC-MS. Dans un premier temps, un dosage d'acide lactique a été effectué au sein de chaque lait fermenté par HPLC (Figure 50).

L'acide majoritairement produit par ces souches est l'acide lactique. La présence du ferment d'acidification permet d'obtenir un niveau basal de cet acide dans les laits fermentés et pouvoir ainsi s'affranchir de son pouvoir inhibiteur individuel.

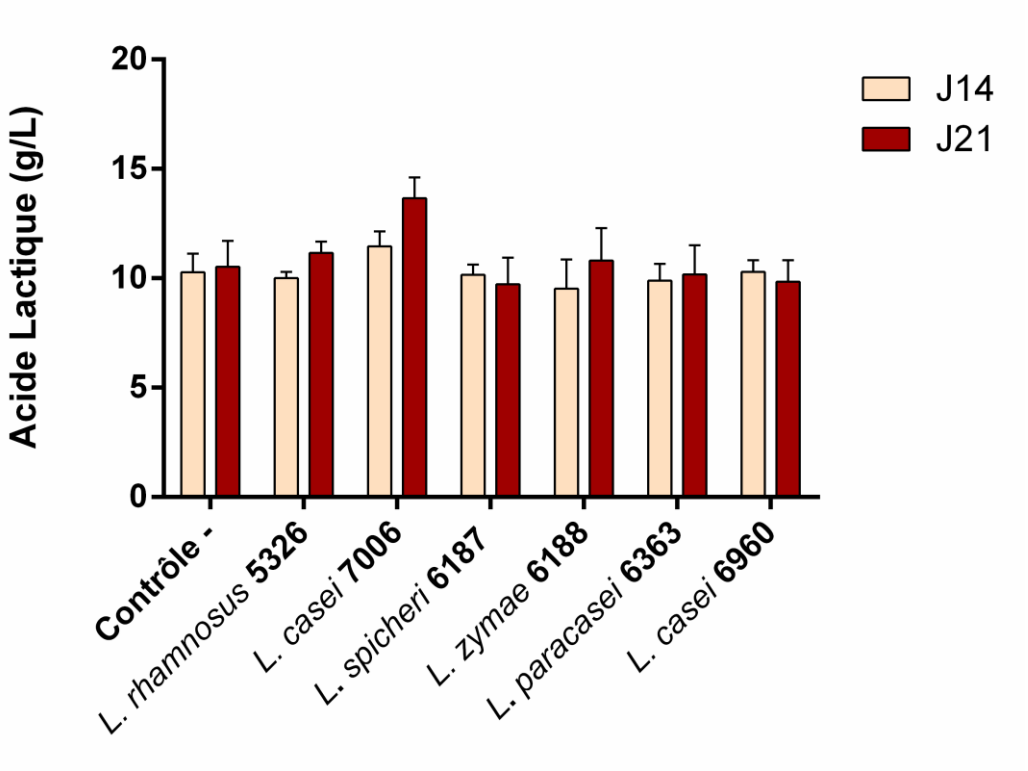


Figure 50 : Concentration d'acide lactique dosé au sein des différents laits fermentés par HPLC sur colonne aminex HPX-87 après 14 et 21 jours de stockage.

Après 14 jours de stockage à 7°C, la concentration d'acide lactique dans tous les laits fermentés est similaire et comprise entre 9,9 et 11,5 g/L (Tests de student, p-values > 0,05). Après 21 jours, la concentration d'acide lactique dans laits fermentés est similaire à J14 et est comprise entre 9,7 et 10,8 g/L excepté pour le lait fermenté réalisé avec le ferment *L. casei* 7006 qui possède une concentration significativement plus élevée à 13,7 g/L (Test de Student, p-value = 0.0231).

L'acide lactique étant un antifongique, l'augmentation de sa concentration dans le lait fermenté contenant le ferment *L. casei* 7006 a potentiellement un impact positif sur l'activité anti-*Candida* dans cette matrice, seul ou en synergie avec d'autres molécules. Cependant, l'activité retrouvée à J14 pour le ferment *L. casei* 7006 (diminution de croissance de 2,17 log de C*. lusitaniae* 3668), sans différence significative de concentration en acide lactique, fait pencher la balance vers cette seconde hypothèse impliquant la présence d'autres molécules antifongiques. L'analyse en HPLC des acides organiques majoritaires n'a pas révélé la présence d'acide acétique au sein des laits fermentés (résultats non présentés).

4. Recherche d’acides organiques minoritaires

Afin d'identifier les molécules antifongiques présentes, une analyse par LC-MS (approche QuEChERS) a été réalisée pour identifier puis doser des acides organiques mineurs connus. Comme pour les milieux MRS-Glc et lait, le rendement d’extraction dans ce milieu de 14 molécules antifongiques a été déterminé (Tableau 16). Les résultats obtenus montrent que l’ensemble des 14 molécules recherchées peuvent être extraites par QuEChERS en laits fermentés avec des rendements moyens d’extraction compris entre 92 % pour l’acide DL-p-hydroxyphenyllactique et 130% pour l’acide salicylique. Lors des analyses des laits fermentés réalisés avec les souches de biopréservation, quatre molécules ont été détectées puis dosées : l’acide 2-(S)-hydroxyisocaproïque, l’acide phényllactique, l’acide benzoïque, l’acide 4-hydroxyphényllactique (Figure 51, 52, 53 et 54).

Tableau 16 : Rendement d'extraction en laits fermentés de 14 molécules antifongiques connues

Molécules	Rendement (%)		
Acide DL-p-hydroxyphényllactique	92	+/-	15,4
Acide 4-hydroxybenzoïque	145	+/-	4,1
Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique	101	+/-	13,9
Acide vanillique	110	+/-	14,0
Acide caféique	95	+/-	8,3
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	65	+/-	29,7
Acide 3-(4-hydroxyphényl) propionïque	129	+/-	16,3
Acide p-coumarique	104	+/-	3,9
Acide phényllactique	119	+/-	13,2
Acide férulique	98	+/-	2,8
Acide benzoïque	106	+/-	7,5
Acide salicylique	130	+/-	32,3
Acide hydrocinnamique	124	+/-	6,3
Acide méthylcinnamique	96	+/-	26,6

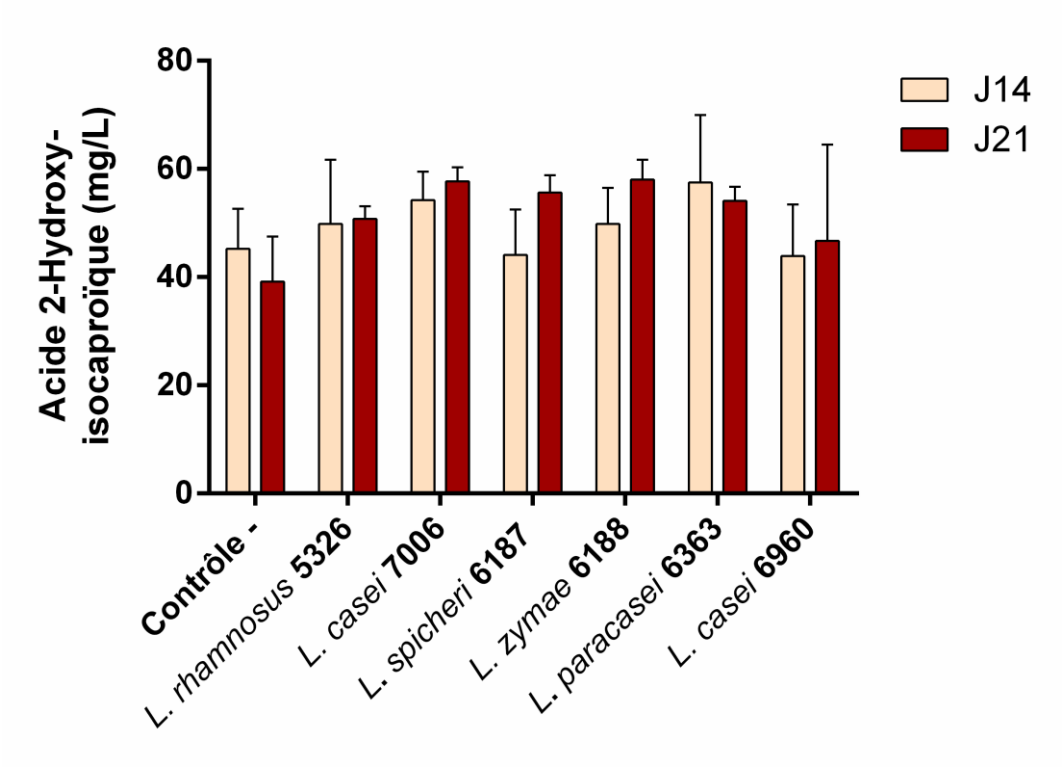


Figure 51 : Concentration en acide 2-hydroxyisocaproïque extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours.

L'acide 2-hydroxyisocaproïque est l'acide retrouvé majoritairement lors des analyses par approche QuEChERS dans les laits fermentés. Dans un lait fermenté sans ferment de biopréservation, cet acide est en moyenne retrouvé à une concentration de 45,2 mg/L à 14 jours et en moyenne à 39,5 mg/L après 21 jours de stockage. Ces valeurs correspondent au niveau basal de production de cet acide par les ferments d'acidification. Les concentrations à 14 et 21 jours ne sont pas significativement différentes, la concentration de cet acide est donc stable dans le temps (Test de Student, p-value=0,8751).

A 14 jours de stockage, la production de cet acide dans les laits fermentés contenant des ferments de biopréservation n'est pas significativement différente d'un lait fermenté sans ferment (Test de student, p-values > 0,05) avec des moyennes de production comprise entre 41,5 et 57,3 mg/L. Ce qui suggère qu'il n'y a pas, ou peu, de production de cet acide par les ferments de biopréservation.

A 21 jours de stockage, les concentrations en acide 2-hydroxyisocaproïque des laits fermentés contenant les ferments *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 6960 ne

sont pas significativement différentes d'un lait fermenté sans ferment de biopréservation (Test de Student, p-value > 0,05). Pour les ferments *L. paracasei* 6363, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188, on constate une augmentation faible mais significative de la concentration en acide 2-hydroxyisocaproïque par rapport au lait fermenté sans ferment avec des moyennes de : 54,1, 57,7, 55,6 et 49,5 mg/L respectivement (Test de Student, p-values < 0.05).

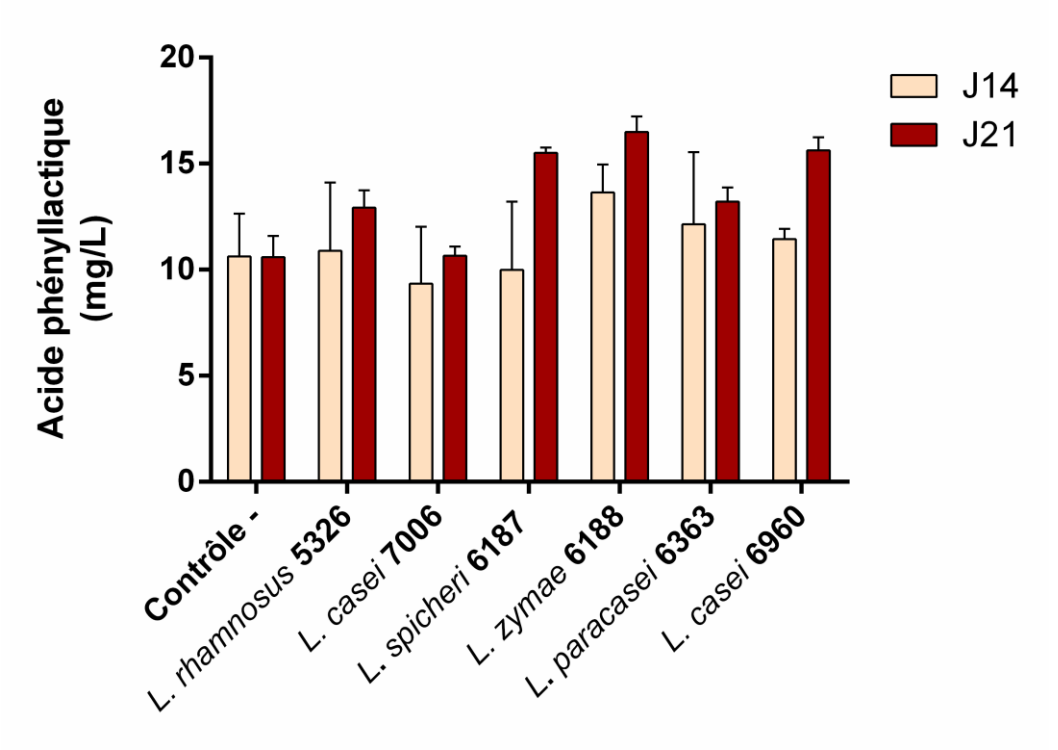


Figure 52 : Concentration en acide phényllactique extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours.

L'acide phényllactique est retrouvé dans chaque lait fermenté analysé. En l'absence de ferment de biopréservation, le taux de cet acide est stable dans le temps avec une valeur moyenne de 10,6 mg/L à 14 comme à 21 jours. Ce taux représente le niveau basal de cet acide produit par les ferments d'acidification. A 14 jours de stockage, la concentration en acide phényllactique déterminée dans chaque lait fermenté contenant des ferments de biopréservation n'est pas significativement différente d'un lait fermenté sans ferment (Test de student, p-values > 0,05). Les ferments de biopréservation n'ont donc pas ou peu produit cet acide après 14 jours de procédé.

Après 21 jours de stockage à 7°C, la concentration en acide phényllactique reste stable pour les laits fermentés contenant les ferments *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. paracasei* 6363. En ce qui concerne ceux réalisés avec les ferments *L. casei* 6960, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188, on constate une augmentation significative du taux d'acide phényllactique : de 11,4 à 15,6 mg/L, de 10 à 15,5 mg/L et de 13,6 à 16,4 mg/L respectivement. Pour ces trois laits fermentés, cette augmentation ne se traduit pas par une augmentation de l'activité. De plus, les laits fermentés contenant les ferments de biopréservation *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006, avec la plus forte activité, possèdent le même taux d'acide phényllactique (et d'acide lactique) qu'un lait fermenté sans ferment. L'association de ces deux acides n'explique donc pas l'activité retrouvée.

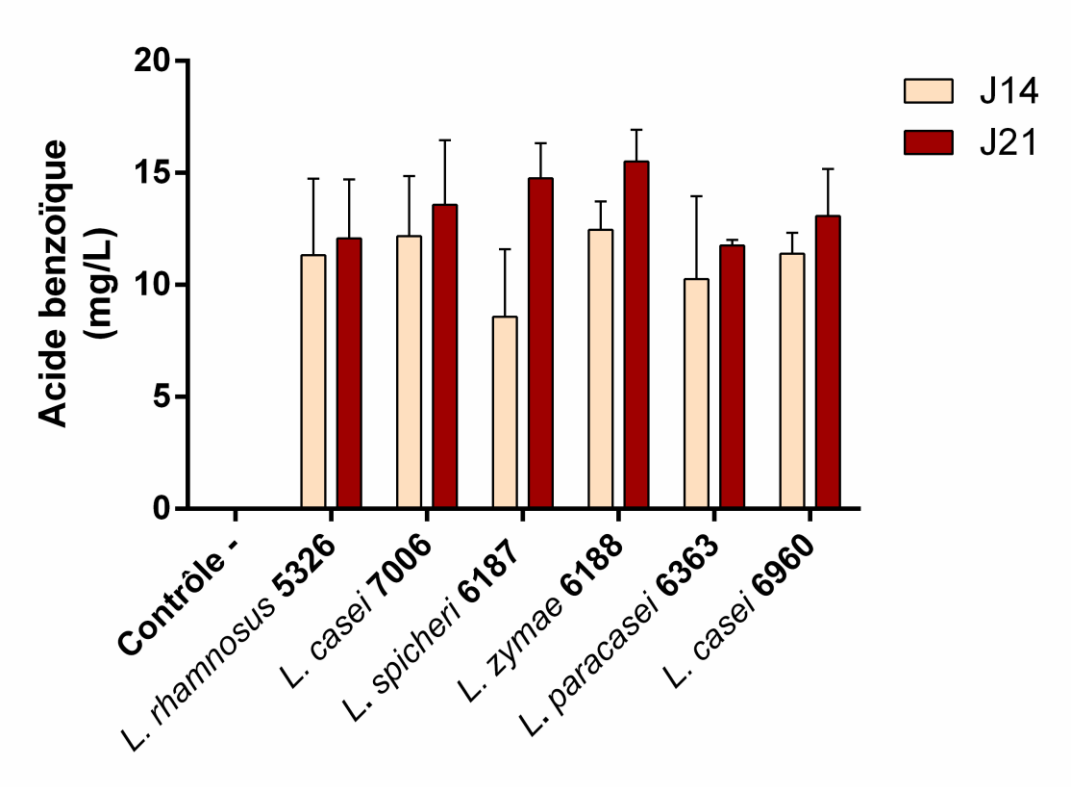


Figure 53 : Concentration en acide benzoïque extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours

A la différence de l'acide 2-hydroxyisocaproïque et de l'acide phényllactique, l'acide benzoïque n'est pas détecté dans un lait fermenté sans ferment de biopréservation. Les ferments d'acidification ne produisent donc pas ou peu cette molécule dans cette matrice et la quantité détectée est donc liée uniquement aux

ferments de biopréservation. Lors des monocultures en milieu lait, cet acide n'avait été retrouvé que dans les surnageants des souches *L. casei* 7006, *L. zymae* 6188 et *L. casei* 6960.

A 14 jours de stockage, la quantité d'acide benzoïque n'est pas significativement différente entre les laits fermentés : de 8,5 à 12,5 mg/L en moyenne. De même, la quantité détectée semble stable lors du stockage puisque qu'aucune différence significative n'est détectée entre les laits fermentés de 14 et 21 jours (Test de student, p-values > 0,05) excepté pour deux laits fermentés : les matrices inoculées avec les ferments *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 présentent une augmentation de 8,6 à 14,8 mg/L et 12,5 à 15,5 mg/L respectivement. Cependant ces souches ne montrant pas d'activité bioprotectrice laits fermentés, ces quantités ne sont donc pas suffisantes pour permettre l'action antifongique de l'acide benzoïque.

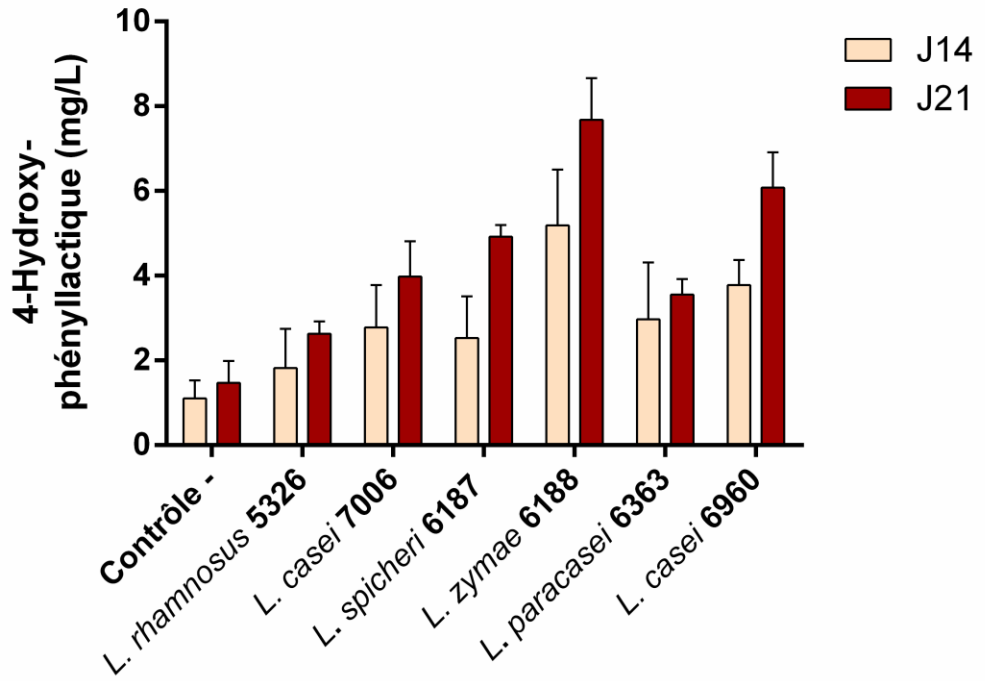


Figure 54 : Concentration d'acide 4-hydroxyphényllactique extrait puis dosé à partir des différents laits fermentés par approche QuEChERS après 14 et 21 jours.

Dans un lait fermenté sans ferment de biopréservation, l'acide 4-hydroxyphényllactique est détecté à une concentration de 1,1 mg/L à 14 jours de stockage et à 1,5 mg/L à 21 jours. Ce taux basal de production par les ferments

d'acidification est stable au cours du temps. La production de cet acide à 14 jours n'est pas significativement différente dans les laits fermentés réalisés avec les ferments *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. paracasei* 6363 (Test de student, p-values > 0,05). Cette production est plus importante dans les laits fermentés contenant les ferments *L. casei* 6960 et *L. zymae* 6188 avec 3,8 et 5,2 mg/L d'acide 4-hydroxyphényllactique. A 21 jours de stockage, la concentration en acide 4-hydroxyphényllactique est significativement différente pour l'ensemble des laits fermentés contenant des ferments de biopréservation avec des moyennes comprises entre 2,2 mg/L avec le ferment *L. rhamnosus* 5326 et 7,7 mg/L avec le ferment *L. zymae* 6188.

En résumé, les acides organiques minoritaires produits par les lactobacilles détectés en lait fermenté ne sont pas, ou pas à eux seuls, responsables de l'activité constatée dans les laits fermentés contenant les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 contre la croissance de la souche *C. lusitaniae* 3668. D'autres molécules actives, de natures différentes, ont donc été recherchées.

5. Recherche de molécules peptidiques actives

Si quelques études décrivent la production de composés antifongiques de nature protéique en milieu MRS par des bactéries lactiques, une seule décrit la présence de peptides antifongiques en matrice laitière, issus de la dégradation de la caséine **(Mcnair *et al* 2018)**. Ainsi, la fraction aqueuse d'un échantillon de crème fraiche inoculée par des souches *L. rhamnosus* CH126 et *L. paracasei* à 5.10^6 UFC/mL avait entrainé l'inhibition de croissance de *Debaryomyces hansenii* de 50% **(McNair *et al.,* 2018)**. Cette inhibition avait été corrélée à la présence d'un peptide issu de la digestion de caséine (DMPIQAFLLY).

Nous avions précédemment montré que les souches actives ne produisaient pas de molécule antifongique de nature protéique en MRS. Toutefois, la libération en laits fermentés de peptide actif issu de la dégradation de la caséine ne peut pas être exclue. En conséquence, nous avons recherché la présence de peptide actif en laits fermentés. Les molécules de nature protéique issues du petit lait des laits fermentés contenant les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 ont été isolées par précipitation au sulfate d'ammonium et testées contre la croissance de *C. intermedia*

3669 (souche la plus sensible) (Figure 55). Aucune de ces deux fractions ne s'est révélée active, laissant supposer l'absence de peptides actifs contre cette souche dans les laits fermentés.

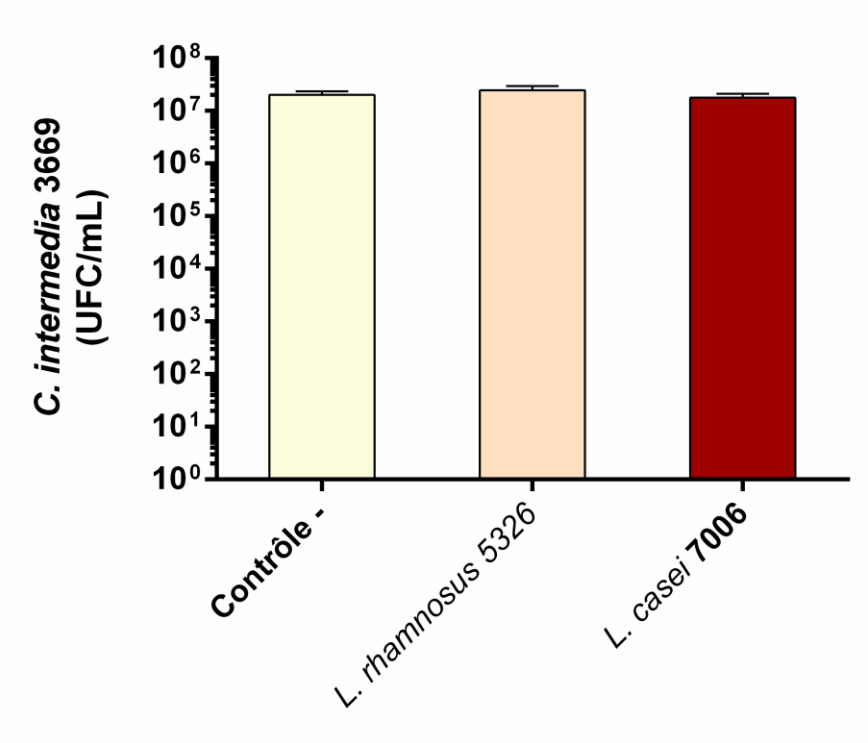


Figure 55 : Tests d'activité des fractions protéiques isolées des petits laits des laits fermentés contenant la souche *L. rhamnosus* 5326 ou *L. casei* 7006

6. Recherche d'acides gras actifs

De nombreux acides gras, saturés, hydroxylés ou non, ont été décrits comme possédant une activité antifongique envers des moisissures et/ou des levures **(Bergsson *et al.*, 2001; Black *et al.*, 2013a; Broberg *et al.*, 2007; Ndagano *et al.*, 2011; Sjogren *et al.*, 2003)**. C'est pourquoi les acides gras contenus dans le petit lait de trois laits fermentés (à 21 jours) ont été extraits avec un mélange chloroforme/méthanol. Ils ont été méthylés puis analysés en GC. Les laits fermentés contenant le ferment d'acidification et la souche *L. casei* 7006 (souche active) ou *L. casei* 6960 (souche de la même espèce mais inactive) ont été étudiés, ainsi qu'un lait fermenté contrôle sans lactobacilles.

Afin d'identifier les acides gras extraits, deux mélanges de standards ont été analysés en GC. Ces deux mélanges comportent au total 33 acides gras, saturés ou

non, de longueur de chaine allant de 4 à 24 carbones. Les profils de séparation de ces acides sont présentés sur la figure 56 et leurs abondances relatives dans le tableau 17.

Les acides méthylés détectés à partir des laits fermentés sont : le méthyl-dodecanoate (soit l'acide dodécanoïque, C12), le méthyl-myristate (soit l'acide tétradécanoïque, C14), le méthyl-pentadecanoate (soit l'acide pentadécanoïque C15), le méthyl-palmitoleate (soit l'acide 9 Z-hexadécénoïque, C16:1), le méthyl-palmitate (soit l'acide hexadécanoïque, C16), les acides méthylés de C18:1 et C18:2, la méthyl-stéarate (soit l'acide octadécanoïque, C18), le méthyl-béhénate (soit l'acide docosanoïque, C22), le méthyl-tricosanoate (soit l'acide tricosanoïque, C23) et le méthyl-tétracosanoate (soit l'acide tétracosanoïque, C24) (Figure 57, Tableaux 17).

Avant l'extraction des acides gras, une quantité de 5 mg d'acide heptadécanoïque (C17) a été ajouté aux trois laits fermentés comme étalon interne. Ainsi, afin de pouvoir quantifier relativement les acides retrouvés, l'aire des pics obtenus en GC pour chaque acide a été normalisée par rapport à celle de l'étalon interne (Tableaux 17 à 20). Les acides gras libres détectés par cette analyse peuvent provenir du lait, de débris membranaires de bactéries ou bien du métabolisme bactérien. Le lait contient des acides gras d'une longueur de C4:0 à C18:0 **(Mannion *et al.*, 2016)**. Par exemple, l'acide pentadécanoïque (C15) est détecté. Cependant, il s'agit d'un acide gras rare dont la principale source est le lait **(Smedman *et al.,* 1999)**. Par ailleurs, le lait utilisé est écrémé, les acides gras provenant de la matrice ne peuvent donc être présents qu'en faible abondance.

Des acides gras connus pour avoir une activité anti-*Candida* sont présents dans les analyses. Il s'agit des acides décanoïque (C10), dodécanoïque (C12), 9 Z-hexadécénoïque (16:1), linoléïque (C18:2) **(Kabara et *al.*, 1972, Bergsson *et al.,* 2001)**. Cependant, parmi les 11 acides gras retrouvés dans les trois échantillons, tous ont des abondances relatives similaires entre les laits fermentés sans ferment de biopréservation et ceux contenant les souches *L. casei* 7006 et *L. casei* 6960. Ainsi, la présence d'acides gras, aux propriétés antifongiques décrites précédemment, n'est pas à l'origine de l'activité présente dans le lait fermenté de la souche *L. casei* 7006.

Belguesmia et collaborateurs ont montré l'activité antifongique de l'acide héxanoïque (C6) contre *P. expansum*, *P. roqueforti*, et *D. hansenii*. Cependant, les acides gras courts (de C4 à C8) ont la propriété d'être volatiles, et également solubles dans l'eau. Lors de nos analyses, la présence de ces acides peut être sous-estimée du fait notamment des étapes d'évaporation des solvants. En conséquence, l'analyse de molécules volatiles produites par les souches de biopréservation a été réalisée.

Tableau 17 : Abondances relatives normalisées des acides gras retrouvés dans les laits fermentés sans ferment de biopréservation ou contenant les ferments *L. casei* 7006 et *L. casei* 6960.

Molécules	**Formule brute**	**Longueur de la chaine carbonnée non méthylé**	**Temps de rétention**	**Numéro chromato-gramme**	**Contrôle sans ferment**			***L. casei* 7006**			***L. casei* 6960**		
Methyl butyrate	C5H10O2	C4	2,41	1									
Methyl hexanoate	C7H14O2	C6	2,5	11									
Methyl octanoate	C9H18O2	C8	3,16	2									
Methyl decanoate	C11H22O2	C10	3,75	3									
Methyl undecanoate	C12H24O2	C11	4,03	12									
Methyl dodecanoate	C13H26O2	C12	4,31	4	26,0	±	6,3	27,0	±	10,0	24,0	±	11,9
Methyl tridecanoate	C14H28O2	C13	4,59	13									
Methyl myristoleate	C15H28O2	C14:1	4,85	14									
Methyl myristate	C15H30O2	C14	4,94	5	106,0	±	39,8	106,3	±	33,7	93,0	±	26,0

Molécules	formule brute	Longueur de la chaine carbonnée non méthylé	Temps de rétention	Numéro chromato-gramme	Contrôle sans ferment			*L. casei* 7006			*L. casei* 6960		
Methyl cis-10-pentadecenoate	C16H30O2	C15:1	5,29	15									
Methyl pentadecanoate	C16H32O2	C15	5,38	16	13,7	±	5,9	13,7	±	4,7	12,2	±	3,7
Methyl palmitoleate	C17H32O2	C16:1	5,73	17	18,3	±	10,8	19,1	±	7,0	16,3	±	5,0
Methyl palmitate	C17H34O2	C16	5,84	6	388,0	±	174,3	387,9	±	131,4	342,1	±	103,4
Methyl cis-10-heptadecenoate	C18H34O2	C17:1	6,31	18									
Methyl heptadecanoate	C18H36O2	C17	6,45	19	100,0	±	0,0	100,0	±	0,0	100,0	±	0,0
Methyl linolenate	C19H32O2	C18:3	6,83	20									
Methyl linoleate ou Methyl linolelaidate	C19H34O2	C18:2	6,94	21	23,3	±	16,0	8,5	±	6,2	17,5	±	19,4

Molécules	Formule brute	Longueur de la chaine carbonnée non méthylé	Temps de rétention	Numéro chromato-gramme	Contrôle sans ferment	*L. casei* 7006	*L. casei* 6960
Methyl oleate ou Methyl elaidate	C19H36O2	C18:1	7,03	22	341,4 ± 313,1	380,7 ± 187,6	336,8 ± 156,9
Methyl stearate	C19H38O2	C18	7,2	7	163,3 ± 88,1	165,3 ± 63,3	144,6 ± 54,1
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	C21H32O2	C20:5	8,33	23			
Methyl arachidonate	C21H34O2	C20:4	8,43	24			
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	C21H36O2	C20:3	8,52	25			
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	C21H36O2	C20:3	8,52	25			
cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	C21H38O2	C20:2	8,69	26			
Methyl cis-11-eicosenoate	C21H40O2	C20:1	8,78	27			
Methyl arachidate	C21H42O2	C20	9,01	8			

Molécules	Formule brute	Longueur de la chaine carbonnée non méthylé	Temps de rétention	Numéro chromato-gramme	Contrôle sans ferment			*L. casei* 7006			*L. casei* 6960		
Methyl heneicosanoate	C22H44O2	C21	10,08	28									
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	C23H34O2	C22:6	10,34	29									
cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	C23H42O2	C22:2	10,88	30									
Methyl cis-13-docosenoate	C23H44O2	C22:1	11,01	31									
Methyl behenate	C23H46O2	C22	11,25	9	19,7	±	15,9	22,3	±	7,9	17,4	±	12,2
Methyl tricosanoate	C24H48O2	C23	12,4	32	54,6	±	35,9	44,4	±	32,3	63,2	±	60,9
Methyl cis-15-tetracosenoate	C25H48O2	C24:1	12,79	33									
Methyl tetracosanoate	C25H50O2	C24	12,93	10	16,6	±	15,9	19,5	±	7,8	14,4	±	11,0

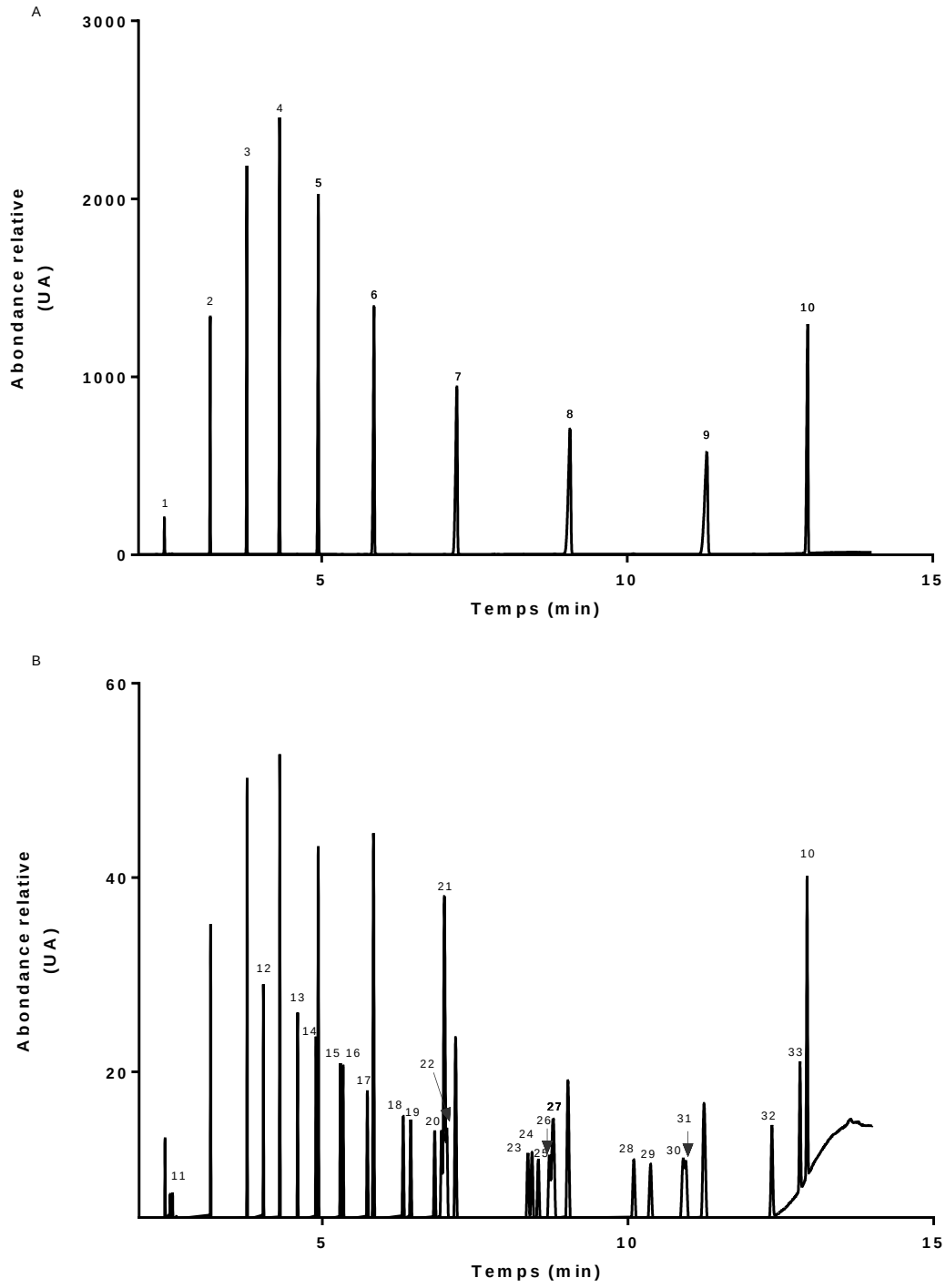


Figure 56 : Profils de séparation de 33 standards d'acides gras (de C4 à C24) en GC sur colonne Agilent HP-5. Séparation d'acide gras saturés (49453-U, C4 - C24 Even Carbon Saturated FAMEs, Sigma, USA) (A). Séparation d'un mélange contenant des acides gras saturés ou non (18919-1AMP, F.A.M.E. Mix, C4-C24, Sigma, USA) (B) Les numéros des pics correspondants sont présentés en tableau 17.

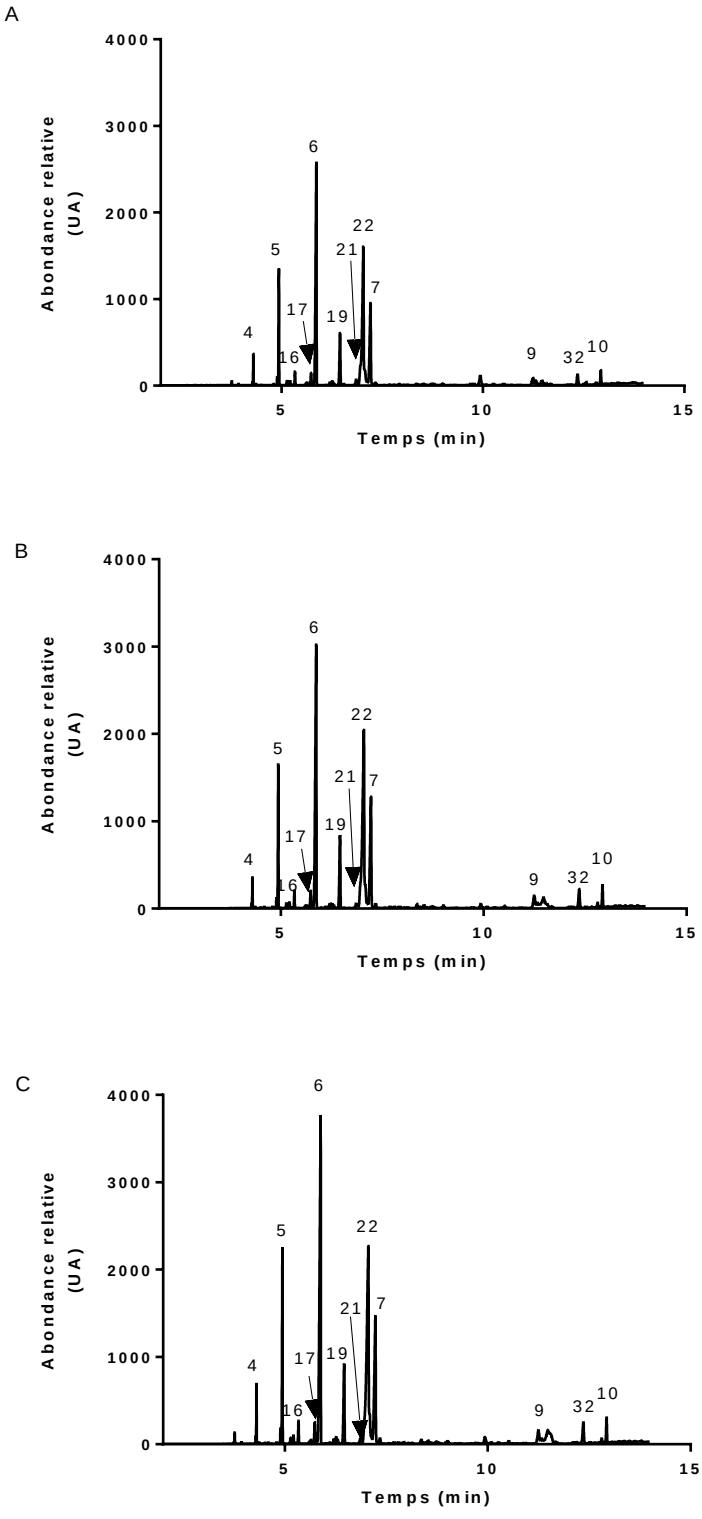


Figure 57 : Profils de séparation des extraits d'acides gras en GC sur colonne Agilent HP-5 issus de différents laits fermentés: sans ferment de biopréservation (A), avec la souche *L. casei* 7006 (B) et avec la souche *L. casei* 6960 (C).

7. Recherche de molécules volatiles actives

Les molécules volatiles produites dans les laits fermentés contenant les souches *L. casei* 7006 et *L. casei* 6960 et le contrôle sans ferment ont été analysées par SPME-GC-MS à 21 jours de stockage à 7°C. Les profils obtenus sont présentés en figure 58.

Dans un lait fermenté sans ferment de biopréservation, différentes molécules volatiles sont retrouvées. Par comparaison avec des standards, nous avons confirmé la présence de diacétyle (1), d'acétoïne (2), d'acide acétique (3), de 2,3 butanediol (4) (même temps de rétention et même spectre de masse) (Figure 58 et 59). Le diacétyle et l'acide acétique sont décrits pour leurs propriétés antifongiques **(Narendranath *et al.,* 2001, Pelàez *et al.,* 2011, Aunsberg *et al.,* 2015)**. Il faut noter que l'acide acétique n'avait pas été détecté dans les petits laits issus de laits fermentés lors de l'analyse en HPLC (IV-D-3). La concentration de cet acide devait être inférieure à la limite de détection en HPLC, soit 0,3 g/L.

Lors de l'ajout de la souche *L. casei* 7006 dans un lait fermenté, seul le pic correspondant au diacétyle présente une aire supérieure au laits fermentés sans ferment : 2 388 345 mUA/min contre 711 532 mUA/min. Afin d'estimer cette différence de production, la quantité de diacétyle a été déterminée à l'aide de la droite d'étalonnage présentée en Figure 60.

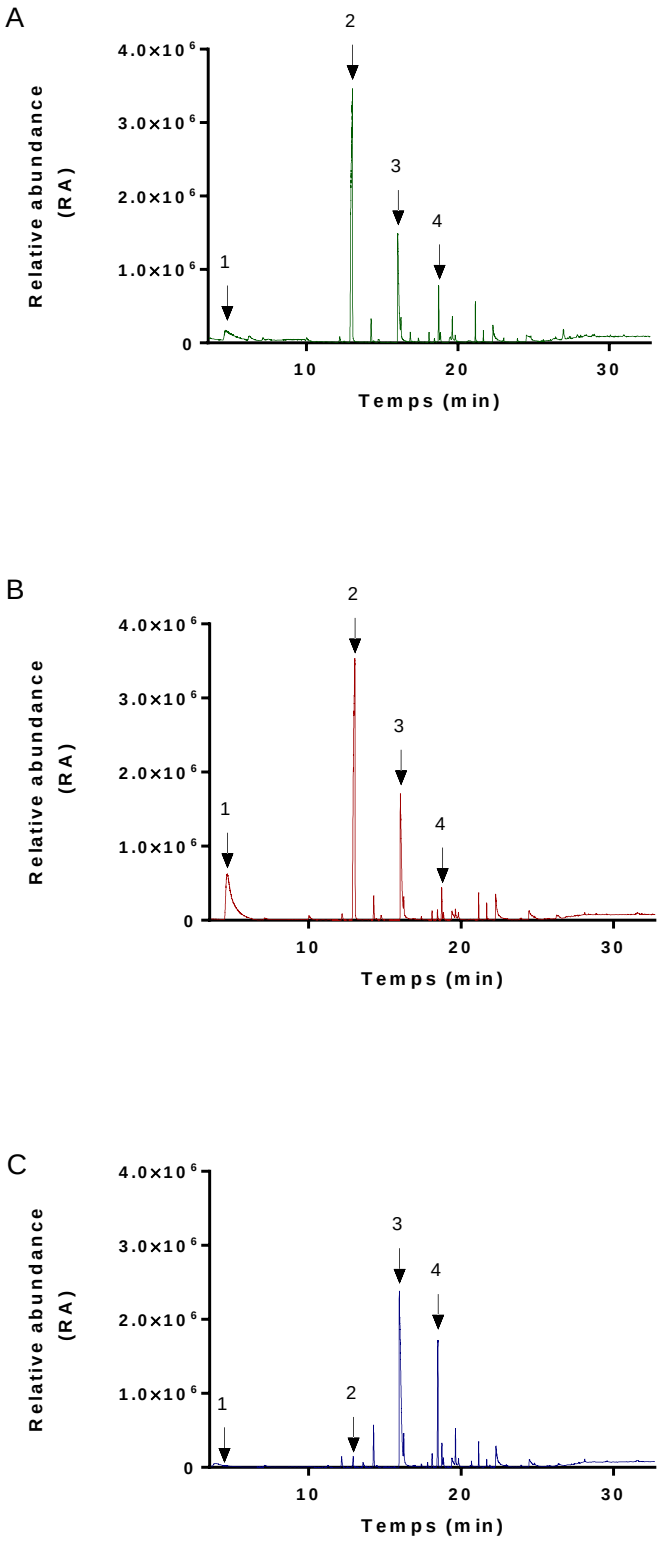


Figure 58 : Analyse par SPME-GC-MS des molécules volatiles présentes dans les laits fermentés ne contenant pas de ferment de biopréservation (A), contenant la souche *L. casei* 7006 (B) ou la souche *L. casei* 6960 après un stockage pendant 21 jours à 7°C. 1 : diacétyle, 2 : acétoïne, 3 : acide acétique, 4 : 2,3-butanediol

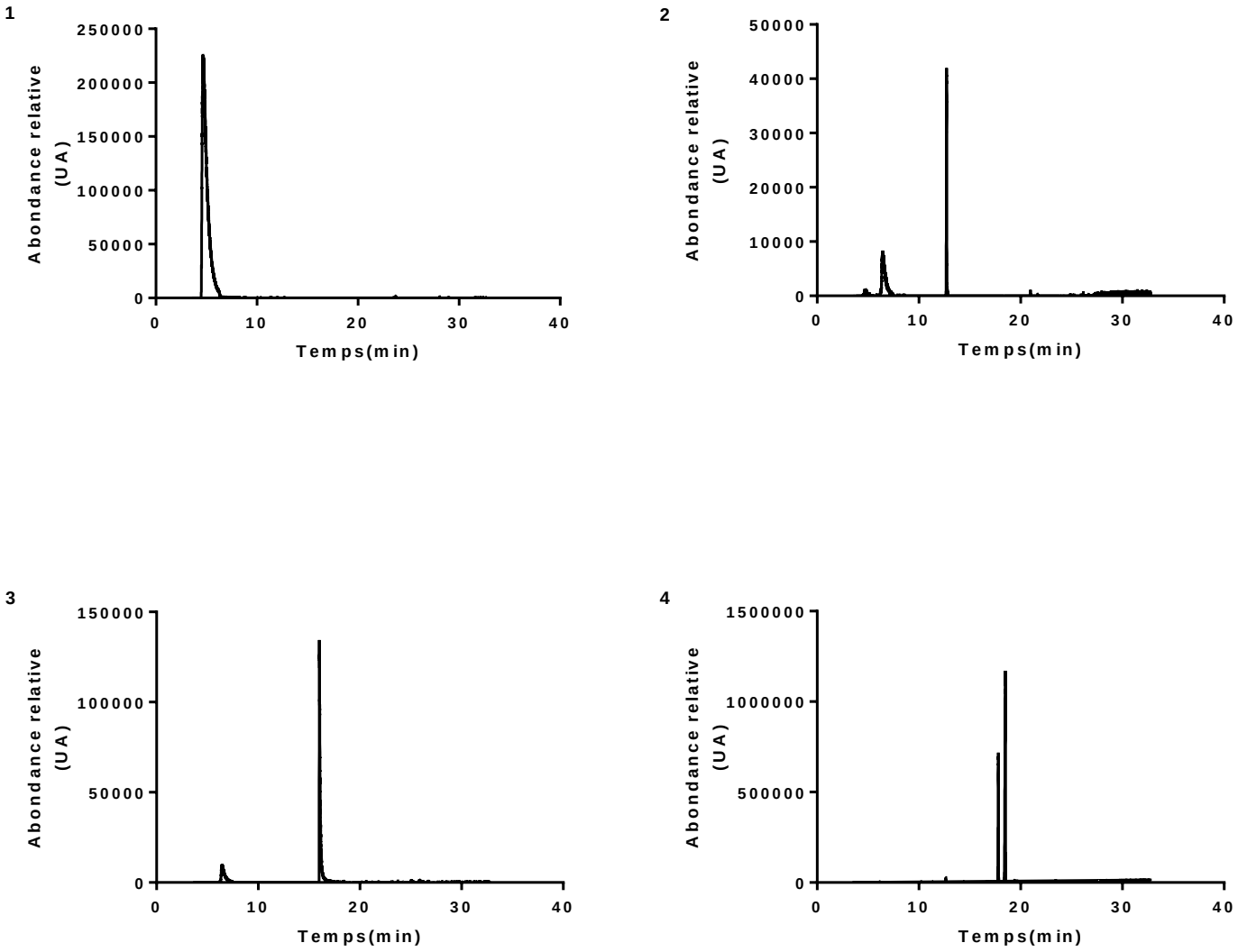


Figure 59 : Détermination du temps de rétention du diacétyle (T = 4,7 min ; m/z :86) (1), de l'acétoïne (T= 12,7 min ; m/z : 88) (2), de l'acide acétique (T = 16.08 min ; m/z :60) (3) et du 2,3-butanediol (4)(T = 17.81 et 18.45 ; m/z : 57) par GC-MS sur colonne DB-WAX (30 m, 0.25 mm, 0.25µm).

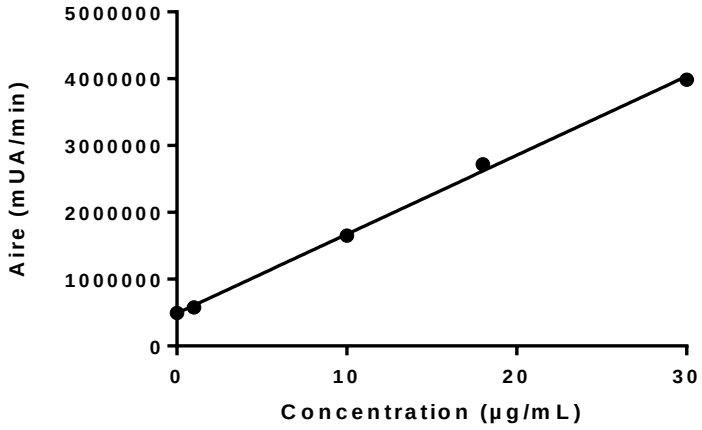


Figure 60 : Droite étalon pour le dosage du diacétyle en SPME-GC-MS (Y= 118232*X + 490707 avec R^2 = 0.9984).

Dans le lait fermenté sans ferment de biopréservation, le taux de diacétyle retrouvé est de 1,8 mg/L. Avec la souche *L. casei* 7006 au sein de lait fermenté, ce taux est presque 10 fois plus important avec 16 mg/L. Dans le lait fermenté contenant la souche *L. casei* 6960 (contrôle négatif), on ne détecte pas la présence de diacétyle. De même, la quantité d'acétoïne est quasi nulle. L'acétoïne et le diacétyle sont tous deux précurseurs du 2,3-butanediol (Figure 61) dont la quantité relative détectée est plus importante avec la souche *L. casei* 6960, (345 973 mUA/min) qu'avec la souche *L. casei* 7006 (16 347 mUA/min) et sans ferment de biopréservation (117 970 mUA/min). Ceci laisserait supposer une conversion des deux précurseurs en 2,3-butanediol par la souche *L. casei* 6960.

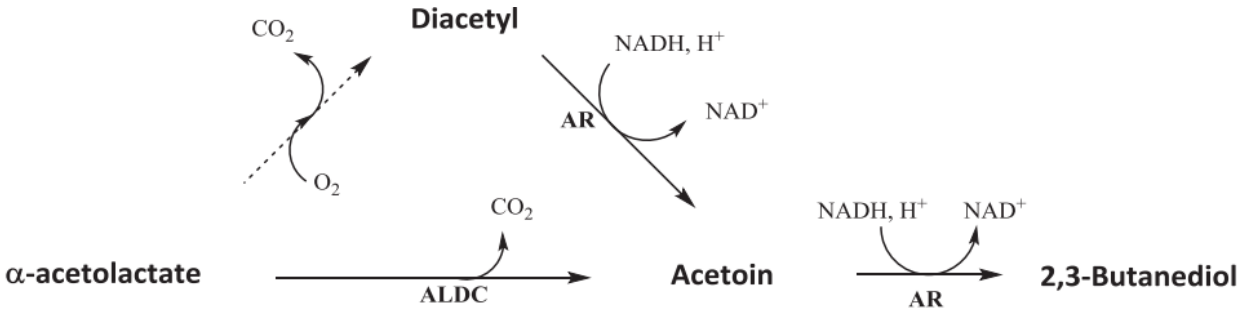


Figure 61 : voies de biosynthèse du diacétyle chez les bactéries lactiques (Issus de **Aunsbjerg *et al.*, 2015**). ALDC: α-acetolactate de-carboxylase, AR: Acetoin reductase

Actuellement, une seule étude décrit un lien entre la production de diacétyle et l'activité antifongiques par des bactéries lactiques en matrice lactée, ici du yaourt **(Aunsberg *et al.,* 2015)**. Ainsi, l'association de ferments d'acidification et de la souche *L. paracasei* DGCC 2132 a montré l'accroissement de concentration de cette molécule. Les yaourts réalisés avec ce ferment ont une concentration de diacétyle de 13.5 +/- 0.54 mg/L contre 3.1 +/- 0.2 mg/L pour ceux obtenus sans ce ferment. La présence de cette molécule a été corrélée à l'inhibition de croissance de *Penicillium solitum* DCS 302 et *Penicillium sp. nov*. DSC 1541. Dans notre étude, les quantités de diacétyle avec *L. casei* 7006 (16 mg/L) et sans ferment d'acidification (1,8 mg/L) sont similaires à celles décrites par Aunsberg et collaborateurs. Parmi l'ensemble des molécules antifongiques identifiées, il s'agit de la première différence de production observée entre les laits fermentés contenant une souche active (ici *L. casei* 7006) ou inactive (ici *L. casei* 6960). Pour confirmer l'activité du diacétyle, une supplémentation de cette molécule dans de nouveaux challenge tests en laits fermentés va être réalisé sans ajout de ferment de biopréservation.

F - Obtention de mutants surproducteurs ou non-producteurs de molécules antifongiques par mutagénèse aléatoire

1. Mutagenèse par irradiation UV

Afin d'obtenir des mutants dont la production de molécules antifongiques est supérieure à celle des souches sauvages, deux banques de mutants aléatoires obtenus par irradiation UV ont été réalisées à partir des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006. Par cette approche, des mutants de la souche *L. lactis* NCIM 2368 capables de surproduire de l'acide lactique ont été isolés par Joshi et son équipe en 2010. Ainsi, des suspensions des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 ont été exposées à des irradiations UV allant de 100 000 à 250 000 µJ/cm^2. La dose UV de 200 000µJ/cm2 a entrainé une mortalité de 99,9% de la population pour les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 (Figure 62). Cette irradiation permet donc d'infliger une dose suffisamment importante pour déclencher une mortalité de 3

log_{10}UFC/mL et donc de déclencher des mécanismes de réparation cellulaire chez la population survivante pouvant engendrer des mutations.

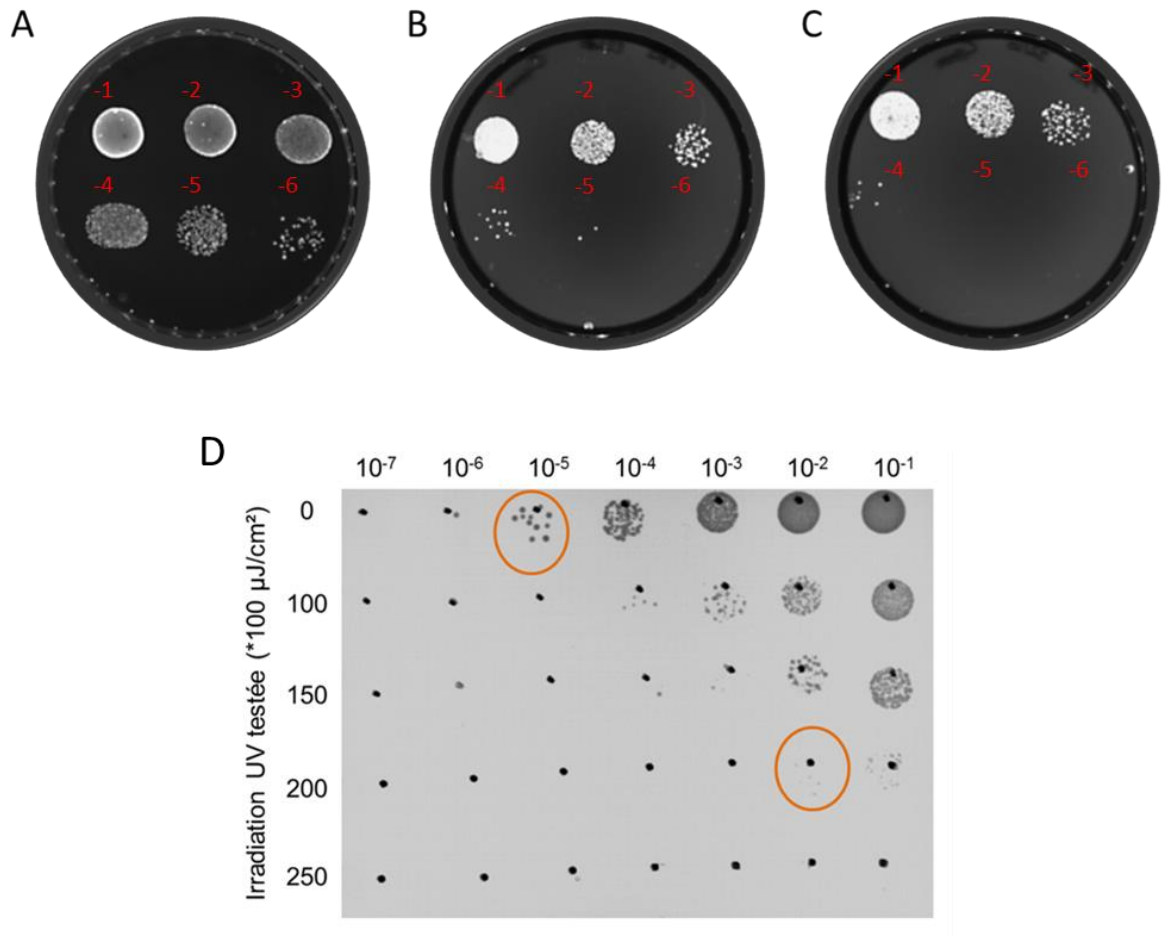


Figure 62 : Sélection des conditions d'irradiation UV permettant d'obtenir un abattement de 99,9% des souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006.
Dilutions décimales et croissance d'une suspension de cellules de *L. rhamnosus* 5326 non irradiées (A), irradiées à 100 000µJ/cm2 (B), irradiées à 200 000 µJ/mL (C). Dilutions décimales et croissance d'une suspension de cellules de *L. casei* 7006 à différentes doses (~ 15 UFC dans les cercles oranges) (D).

Pour sélectionner par la suite d'éventuels mutants dont l'activité antifongique serait modifiée par rapport à la souche sauvage, les cellules irradiées ont été étalées sur boite MRS puis cultivées avant dépôt d'une surcouche de gélose molle inoculée avec la levure cible *C. intermedia* 3669. La présence d'un halo d'inhibition de croissance de la cible autour de colonies isolées de lactobacilles révèle leur activité. Toutefois, pour répondre à l'objectif de détecter facilement toute modification de niveau d'activité, ces halos doivent être d'un diamètre à la fois réduit, pour observer facilement une augmentation d'activité, et suffisamment important pour identifier des

mutants non-producteurs. Pour cela, les lactobacilles ont été cultivés à différentes températures avant ajout de la cible afin de déterminer les meilleures conditions de production de molécules antifongiques pour la détection de halo d'inhibition (Figure 63).

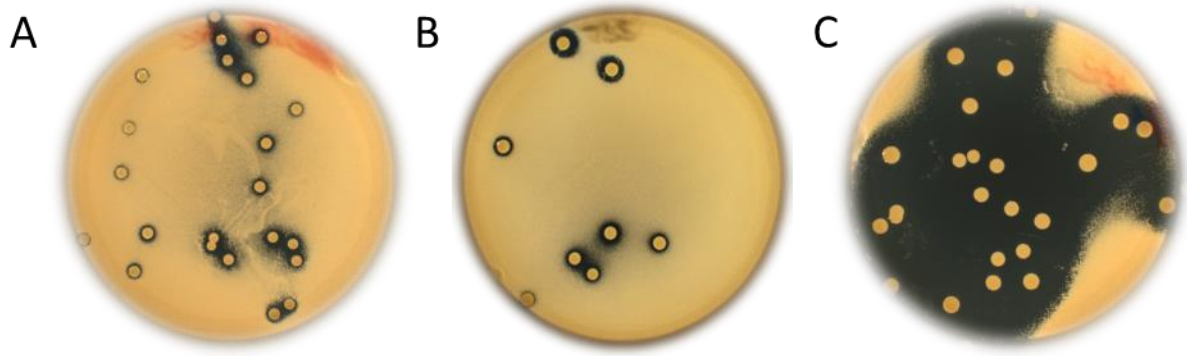


Figure 63 : Tests d'antagonisme de la souche *L. rhamnosus* 5326 sauvage, cultivée à 30°C (A), 37°C (B) ou 42°C (C), avant ajout de C. intermedia 3669 en gélose molle et incubation 25°C pendant 48h.

Lors d'une incubation des lactobacilles à 30°C pendant 48h, les halos d'inhibition contre *C. intermedia* 3669 sont faibles, voire indétectables autour de certaines colonies (Figure 63A). Lorsque cette température d'incubation est élevée à 37°C, la présence de halos d'inhibitions plus importants a été constatée (Figure 63B). A 42°C, les halos d'inhibitions sont de taille trop importante et se confondent entre eux (Figure 63C). Ainsi, la température de 30°C a été sélectionnée pour un criblage d'éventuels mutants surproducteurs de molécules antifongiques. Néanmoins, comme on peut le voir pour les essais à 30°C et 37°C (Figure 63 A et B), le principal écueil de cette technique est la variabilité des tailles de halos observés, qui devraient pourtant être tous identiques. Notre hypothèse est que la gélose molle n'a pas exactement la même épaisseur sur la surface, et donc les molécules antifongiques diffusent plus ou moins facilement à travers cette gélose ce qui conduit à la formation de halos de diamètres différents. De plus, un effet "synergique" a été constaté pour les halos de clones proches dont la taille augmente autour des colonies (figure 63B) et éventuellement peut les rendre indiscernables (figure 63C).

L'activité inhibitrice de 6 000 mutants a toutefois été analysée par cette approche. Parmi eux, 32 colonies ont présenté un halo d'inhibition pour *C. intermedia*

3669 qui semblait légèrement plus important que celui des autres colonies. Ces bactéries ont été cultivées en milieu MRS liquide, puis leur surnageant a été testé en microplaques contre *C. intermedia* 3669 pour des rapports de volume ½, ¼ et ⅛. Cependant, aucun d'entre eux ne s'est révélé avoir une activité antifongique supérieure à la souche sauvage confirmant le manque de précision de la méthode de détection employée.

2. Mutagénèse par transposition

Afin de mettre en évidence les gènes et les voies de biosynthèse impliquées dans la production de molécules antifongiques, une approche de mutagénèse aléatoire par transposition a été tentée. Elle permet potentiellement de générer, par insertion aléatoire d'un transposon, des mutations uniques au sein du génome, facilement identifiables par la suite. Pour cela, deux systèmes de transposition ont été envisagés : les plasmides pV *L. paracasei* 636329 et pVI110 **(Licandro-Serrault *et al.,* 2012)** ou le plasmide pPH-M1 **(Hemarajata *et al.,* 2014)**. Pour utiliser ces systèmes, la transformation des souches bactérienne a été réalisée par électroporation, comme décrit dans la littérature **(De Keersmaecker *et al.,* 2006; Palomino et al., 2010; Licandro-Seraut *et al.,* 2012 ; Landete et al., 2014)**. Plusieurs protocoles, détaillés dans le chapitre Matériel et méthodes (paragraphe III-E-2) ont été testés afin d'obtenir les meilleurs rendements de transformation possibles. La synthèse des différents essais de transformation réalisés pour l'introduction de ces plasmides dans les souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, et *L. spicheri* 6187 est présentée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Protocoles de transformations testés sur les différentes souches actives

	pVI129				pPH-M1
	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3	Protocole 4	Protocole 4
L. rhamnosus 5326	-	-	-	-	-
L. casei 7006	-	NR	NR	NR	+
L. spicheri 6187		NR	NR	NR	-

- : absence de transformants, + : obtention de transformants, NR : non réalisé

Le protocole 1 correspond à une électroporation de cellules bactériennes en présence de PEG 1500 récoltées en phase exponentielle de croissance et rincées à l'eau stérile **(Licandro-Serrault *et al.,* 2012)**. Le protocole 2 se fait également par transformation de cellules en phase exponentielle mais dans un milieu enrichi en glycine (déstabilisation de la synthèse du peptidoglycane) et une électroporation dans des conditions hypertoniques (présence de saccharose à 171 g/L dans le tampon TSM) **(De Keersmaecker *et al.,* 2006)**. Le protocole 3 correspond à la transformation de cellules en phase exponentielle de croissance cultivées dans un milieu hypertonique à 0,9 M de NaCl avec des conditions d'électroporation similaires au protocole 1 **(Palomino *et al.,* 2010)**. Enfin, le protocole 4 est similaire au protocole 2 avec toutefois la présence de saccharose à 0,5 M dans le milieu de culture des bactéries et la présence de glycérol lors de l'électroporation **(Landete *et al.,* 2014)**.

La transformation bactérienne est dépendante de plusieurs facteurs tels que la taille du plasmide ou encore son mécanisme de réplication. En effet, la présence de plasmides endogènes, incompatibles avec le mode de réplication du plasmide à électroporer, n'est pas un paramètre à exclure chez les souches *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006. Plusieurs études ont corrélé ce phénomène d'incompatibilité à de faibles rendements de transformation **(Posno *et al.,* 1991; van der Lelie *et al.,* 1988)**. Ainsi, la transformation sans succès de *L. pentosus* MD353 par le plasmide pLPE317 a été reliée à la présence d'un plasmide endogène de 1,7 kb **(Posno *et al*., 1991)**. Le plasmide pVI129 a un système de réplication en cercle roulant par l'expression d'une protéine diffusible RepR qui reconnait des séquences d'ADN répétées (itérons). Un phénomène de titration des protéines diffusibles de réplication entre les séquences à itérons de deux plasmides peut avoir lieu, ayant un effet inhibiteur sur la réplication d'un des deux plasmides **(Novick, 1987)**. L'expression de la protéine RepR peut également être régulée négativement au sein des cellules, inhibant ainsi la réplication du plasmide exogène **(Novick, 1987)**. Toutefois, l'extraction de plasmides à partir des souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006 et *L. spicheri* 6187 s'est révélée infructueuse.

Avant électroporation dans les lactobacilles, les plasmides ont été amplifiés au préalable chez une souche d'*E. coli*. Le choix de cette souche a une importance

notamment en termes de modifications de l'ADN, en particulier sa méthylation **(Spath *et al.,* 2012)**. En effet, les systèmes de restrictions/modifications sont des mécanismes de défense bactériens qui permettent de dégrader de l'ADN étranger par des enzymes de restrictions. L'absence de méthylation du plasmide peut, dans certains cas, permettre d'augmenter l'efficacité de transformation, comme cela a été montré chez *L. plantarum* CD033 où l'utilisation d'une souche d'*E. coli dam- dcm-* (mutée pour ses deux méthylases) permettait d'augmenter le nombre de clones obtenus substantiellement (plus de 1000 fois) par rapport à la même transformation avec un plasmide méthylé **(Spath *et al.,* 2012)**. Ce gain dépend toutefois du fond génétique : les auteurs notent une augmentation de l'efficacité de transformation chez les 3 *Lactobacillus plantarum* testés mais une baisse chez *Lactobacillus buchneri* CD034 lorsque le plasmide est non méthylé. Ainsi, les deux types de plasmides ont été testés.

a. Système pVI129-pVI110 (Licandro-Serrault *et al.,* 2012)

Le système pVI129-pVI110 nécessite deux transformations successives par ces deux plasmides (principe décrit paragraphe III-E-2-a). Le plasmide pVI129 peut être introduit chez des souches de l'espèce *L. casei* et de l'espèce *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* **(Licandro-Serrault *et al.,* 2012)**. Le mécanisme de réplication de pVI129 est donc potentiellement compatible avec la souche *L. casei* 7006 (*L. casei* 7006). Cependant, la transformation par le plasmide pVI129 n'a rencontré de succès que chez la souche *L. spicheri* 6187 (*L. spicheri* 6187) par le protocole n°1.

Le système décrit par Licandro-Serault et collaborateurs (2012) reposant sur la thermosensibilité de la réplication du plasmide pVI129 pour son curage, suite à la transformation de la souche *L. spicheri* 6187, la stabilité de ce plasmide a été analysée lors de deux cultures successives à 43°C ou à 47°C pour tenter de déstabiliser la réplication du plasmide pVI129. Le plasmide pVI129 conférant une résistance au chloramphénicol, cette stabilité a été évaluée par comparaison entre la population totale et la population résistante (cellules portant le plasmide) (Figure 64).

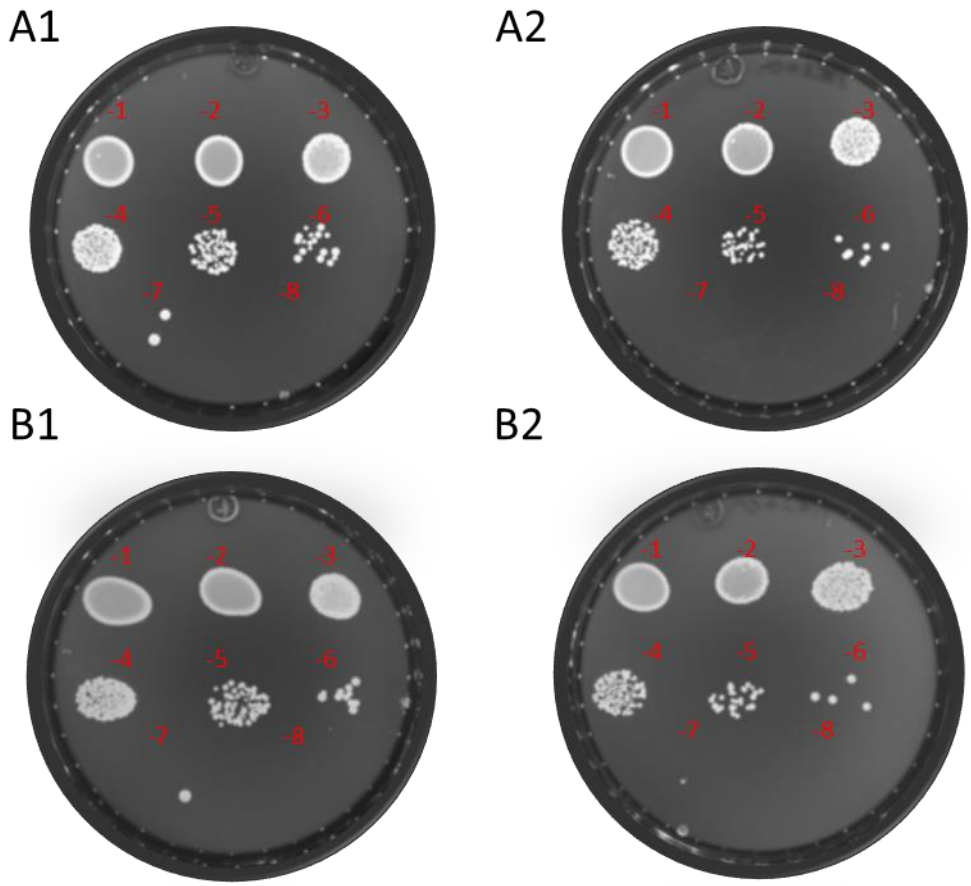


Figure 64 : Suivi de stabilité du plasmide pVI129 en milieu MRS après deux cultures successives.
A 43°C (A) ou 47°C (B), dilutions étalées sur milieu MRS sans (1) ou avec Chloramphénicol 10 mg/L (2). Les dilutions décimales sur milieu MRS donne des populations estimée à $1{,}6.10^9$ UFC/mL pour *L. rhamnosus* 5326 et 9.10^8 UFC/mL pour B1 et sur milieu MRS chloramphénicol à 7.10^8 UFC/mL pour *L. casei* 7006 et 4.10^8 UFC/mL pour B2.

Après deux cultures successives à 43°C comme à 47°C, la population résistante au chloramphénicol, et donc la population possédant toujours le plasmide pVI129, représente environ la moitié de la population finale (7.10^8 UFC/mL sur MRS chloramphénicol contre $1{,}6.10^9$ UFC/mL). Si le plasmide pVI129 se maintient au sein des cellules, la transposase TpaseIS*1223* continuera à être exprimée et pourrait engendrer des évènements multiples de transposition conduisant à une accumulation de mutations non identifiables. Le plasmide pV129 reste donc stable dans les cellules *L. spicheri* 6187 malgré deux cultures successives à 47°C. Le système pVI129-pVI110 n'est donc pas utilisable chez la souche *L. spicheri* 6187.

b. Système pPH-M1

Suite aux difficultés rencontrées avec le système pVI129-pVI110, un nouveau système de transposition a été envisagé. Ainsi le choix s'est porté sur le plasmide pPH-M1 possédant : une transposase inductible à la Nisine (Himar1C9), un transposon associée (*himar1 Tn*) et une origine de réplication thermosensible (*repA(Ts)*).

La transformation de ce plasmide a fonctionné avec la souche *L. casei* 7006. Les étapes suivantes pour la réalisation d'une banque de mutant aléatoire sont actuellement en cours de développement (Induction de la transposition, curage du plasmide).

3. Mise au point d'un test de criblage de mutants en matrice lactée

Dans le but d'isoler des mutants surproducteurs de molécules antifongiques dérivant de la souche *L. rhamnosus* 5326 ou *L. casei* 7006, un test de criblage rapide en plaque 96 puits est actuellement en développement. Dans un premier temps, les conditions permettant de détecter une activité visuellement et rapidement ont été recherchées.

Différentes concentrations des souches *L. casei* 7006 et *L. casei* 6960 ont été utilisées pour définir les paramètres les plus favorables à la détection fine de l'activité. Trois conditions d'incubation anaérobie des géloses inoculées avec les lactobacilles ont été testées : pendant 24 h à 22°C ou 30°C, et pendant 48 h à 22°C (Tableau 19). La température la plus basse correspond à celle employée par l'industriel pour la fermentation des produits laitiers. Après incubation des géloses, 20 UFC de *R. mucilaginosa* ont été déposées dans chacun des puits et le développement de la levure a été suivi visuellement (Figure. 65). En présence de MRS, l'incubation à 22°C pendant 24 h avec la souche *L. casei* 7006 (inoculée à 10^7 UFC/puits) ne retarde la croissance de la levure que de 2 jours par rapport au contrôle sans lactobacilles (Tableau 19). Celle à cette même température pendant 48 h permet, quant à elle, une inhibition de croissance pour un inoculum de 10^7 UFC/puits. Enfin, des inhibitions de croissance de la levure ont été observées pour

un inoculum plus faible de 10^6 UFC/puits à partir des cellules cultivées à 30°C pendant 24 h. C'est donc cette dernière condition de température d'incubation qui a été retenue pour effectuer des criblages.

Tableau 19 : Paramètres évalués pour le test de criblage

Conditions d'incubation	**MRS**		**PBS 1X**		**NaCl 0,9 %**	
	***L. casei* 7006**	***L. casei* 6960**	***L. casei* 7006**	***L. casei* 6960**	***L. casei* 7006**	***L. casei* 6960**
22°C / 24 h	±2J (10^7)	- (10^7)	nt	nt	nt	nt
22 °C / 48 h	+++ (10^7) ±8J (10^6)	- (10^7)	nt	nt	nt	nt
30 °C / 24 h	+++ (10^6) ±8J (10^5)	- (10^7)	±5J (10^7)	- (10^7)	±5J (10^7)	- (10^7)

+++ : Inhibition de croissance de *R. mucilaginosa* 3671, ±x J : retard de croissance (quelques colonies visibles après x jours pour au moins l'un des réplicats), - : absence d'inhibition. Entre parenthèse : inoculum correspondant en UFC/puits. Nt : paramètre non testé. *L. casei* 7006 : souche de *Lactobacillus* active, *L. casei* 6960 : souche de la même espèce inactive, pré-cultures réalisées en MRS à 37°C. MRS, PBS 1X, NaCl 0,9 % : solutions utilisées pour les dilutions intermédiaires.

Afin d'évaluer la taille de l'inoculum nécessaire à l'inhibition de la cible, des dilutions de 2.10^8 à 2.10^2 UFC/mL ont été réalisées en MRS, 10 µL ont été disposés dans les puits et 190 µL de gélose lait ont été ajoutés. En absence de souche bactérienne, la levure se développe mieux dans les puits dans lesquels du MRS a été ajouté que dans ceux ne contenant que de la gélose lait (Figure 65). Le MRS a donc un impact bénéfique non négligeable sur la croissance des levures. C'est pourquoi d'autres solutions (PBS et NaCl 0,9 %), n'apportant pas de sources énergétiques, ont été utilisées pour diluer l'inoculum bactérien (de 2.10^8 à 2.10^2 UFC/mL) dans le but de s'affranchir de l'impact du MRS. Cependant, même cultivée à 30°C, l'activité de la souche *L. casei* 7006 est plus faible lorsque diluée en PBS ou en NaCl qu'en MRS. En effet, avec ces deux tampons, l'inoculum le plus élevé de la

souche *L. casei* 7006 (10^7 UFC/puits) ne retarde la croissance de la levure cible que de 5 jours par rapport à la souche *L. casei* 6960 (Tableau 19), tandis qu'à cette concentration, comme à 10^6 UFC/puits, aucune croissance de la cible n'est observée en présence de MRS (après deux semaines d'incubation à température ambiante). Ceci suggère que même en ne représentant qu'un 20ème du volume dans le puits, le MRS tend à maximiser l'inhibition, soit directement, du fait notamment de l'apport d'acétate, soit indirectement, en permettant une meilleure croissance du lactobacille.

Dans le but d'identifier des mutants plus actifs, deux stratégies peuvent être envisagées : d'une part, trouver des clones actifs à une dilution inférieure à celle de la souche sauvage (10^5 pour les dilutions en MRS par exemple), d'autre part, trouver des mutants présentant, à la même concentration, une activité plus longue dans le temps que le sauvage.

Les conditions testées ne se basant que sur un retard de croissance (PBS, NaCl 0.9%) amènent plus de variabilité en termes d'interprétation. Ainsi, bien que de nombreux biais existent, comme précédemment évoqué, nous avons utilisé la dilution en MRS du fait, d'une part, de la possibilité d'utiliser des quantités plus faibles de lactobacilles, et d'autre part, de la lecture plus rapide du résultat (la cible poussant plus vite). Nous sommes toutefois conscients qu'une validation en challenge tests des candidats sélectionnés sera nécessaire.

Un premier essai a été réalisé pour lequel les activités de 30 mutants UV à 10^6 UFC/puits et 10^5 UFC/puits ont été comparées à celle de la souche *L. casei* 7006 sauvage. Il n'a pas permis d'identifier de clones d'intérêt, mais il sera évidemment réitéré sur un bien plus important panel.

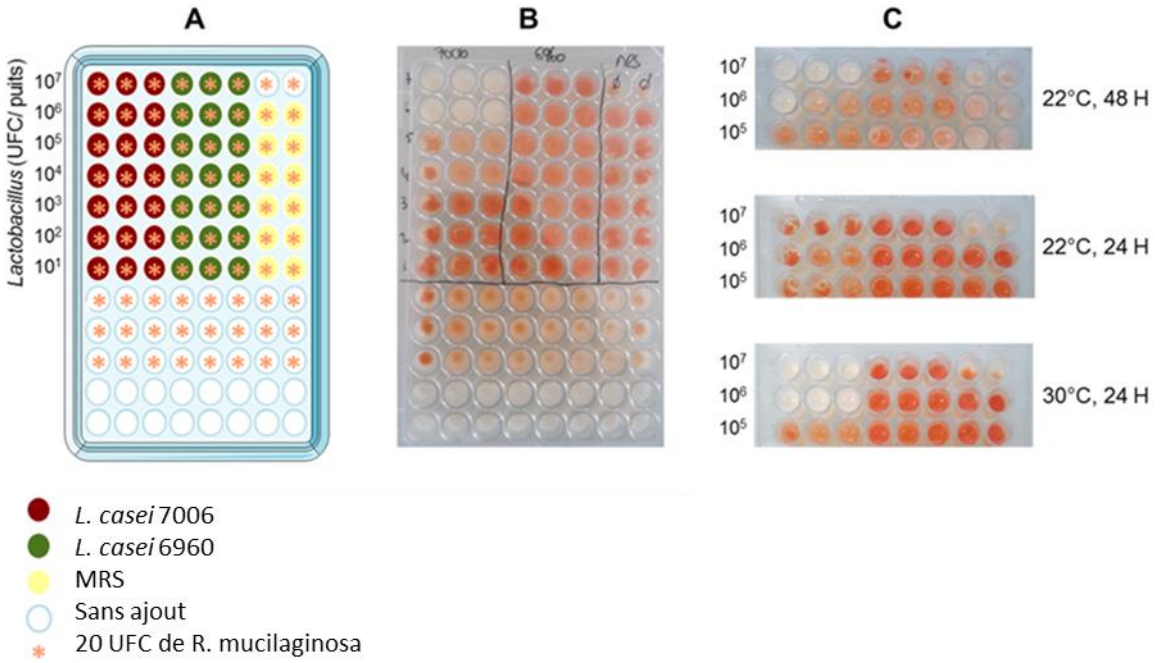


Figure 65 : Test de criblage de souches antifongiques en gélose lait.
(A) : schéma d'inoculation de la plaque 96 puits. (B) : exemple de résultat obtenu avec des dilutions décimales de l'inoculum de *Lactobacillus* en MRS, conditions d'incubation : 30°C, 24 h. (C) : exemple de différentes conditions d'incubation testées. Photographies réalisées après deux semaines de stockage à température ambiante.

VI- Conclusion et perspectives

Ces dernières décennies, la demande des consommateurs en faveur de l'élimination des additifs alimentaires au sein des produits alimentaires ne fait que croître. Ce rejet pousse les industriels, notamment ceux de la filière des produits laitiers, à trouver de nouvelles alternatives pour la conservation. Dans ce cadre, la biopréservation apparait comme l'une des meilleures alternatives à ce jour. Parmi les bactéries lactiques produisant des molécules antifongiques, les lactobacilles sont décrits comme le genre le plus prometteur. De plus, l'utilisation de certaines espèces en production alimentaire est autorisée du fait de leurs statuts GRAS et QPS. Cette thèse avait quatre principaux objectifs : la sélection de souches à l'activité antifongique la plus large, la caractérisation des molécules responsables de cette activité, la transposition de cette activité en milieu industriel et l'augmentation de l'activité par mutagénèse aléatoire.

A. Mise en évidence du potentiel de la souche *L. casei* 7006

La recherche de souches de lactobacilles possédant le spectre antifongique le plus large a constitué l'étape initiale de ce projet. Ainsi, dix-huit souches de lactobacilles ont été criblées sur leur capacité à inhiber la croissance de différentes souches fongiques issues de contaminations laitières. Les cibles utilisées incluaient des moisissures et des levures appartenant aux genres : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Candida*, *Rhodoturula* et *Saccharomyces*. Ce criblage a permis de sélectionner quatre souches au potentiel antifongique intéressant : ***L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae***. De plus, des souches de lactobacilles testées n'ont pas montré d'activité antifongique, comme les souches ***L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960**, ce qui les a désignées comme témoins négatifs de notre étude.

La caractérisation de leur activité antifongique a d'abord été réalisée dans un milieu semi-synthétique, le MRS, puis en lait. Le MRS a conduit à l'observation d'activités qui n'étaient pas retrouvées en milieu lait lors de l'étude des surnageants de culture. Ce constat pouvait s'expliquer notamment par la présence d'acétate de sodium en MRS, l'absence de ce sel conduisant à la perte d'activité des surnageants de culture, confirmant les données de la littérature **(Schillinger and Villarreal, 2010;**

Stiles *et al.,* 2002). Cependant, ces essais omettaient un point important : les effets possibles de l'interaction entre lactobacilles et ferments technologiques, tels que les ferments d'acidification. En effet, afin de montrer le potentiel de biopréservation réel dans un produit final, des travaux récents ont porté sur l'impact de lactobacilles dans le yaourt **(Delavenne *et al.,* 2015; Lačanin *et al.,* 2017)** ou une matrice de type fromage **(Garnier *et al.,* 2018)**. Ainsi, notre étude s'est orientée sur l'évaluation de l'efficacité des quatre souches *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 inoculées à 7 log_{10}UFC/mL en challenge test, dans une matrice « industrielle » : du lait transformé par un ferment d'acidification (constitué d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*) puis stocké à 7°C pendant 21 jours. La souche *L. casei* 7006 a démontré une activité intéressante contre *C. lusitaniae* 3668 en inhibant sa croissance de 3,6 log_{10}UFC/mL dans les laits fermentés ainsi obtenus. La souche *L. rhamnosus* 5326 a, quant à elle, une activité plus faible avec une inhibition de 1,3 log_{10}UFC/mL tandis que les souches *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188 se sont révélées inactives dans ce modèle. La suite de l'étude s'est donc focalisée sur les molécules antifongiques produites par la souche *L. casei* 7006 en challenge test afin de comprendre l'inhibition de croissance engendrée chez *C. lusitaniae* 3668.

Les essais de biopréservation en challenge test n'ont été réalisés que contre la souche *C. lusitaniae* 3668. Cette cible fongique retrouvée dans les contaminations de produits laitiers apparaissait comme l'une des plus résistantes lors des tests de criblages, après la souche *S. boulardii* 3667, et donc comme l'une des souches les plus pertinentes pour les premiers challenges tests. De nouveaux essais contre des cibles plus diverses (représentant mieux les contaminations de terrain) et/ou plus résistantes pourraient être pertinents afin d'analyser le potentiel antifongique de la souche *L. casei* 7006, notamment contre des moisissures (*Aspergillus, Penicillium*) et d'autres levures comme *S. boulardii* 3667, des souches de *S. cerevisiae*, *Z. bailii* ou encore *Y. lipolitica*.

B. Vérification de l'innocuité de la souche *L. casei* 7006

Pour garantir la sécurité du consommateur, plusieurs analyses de la souche *L. casei* 7006, ou de n'importe quelle souche sélectionnée pour être utilisée en bioprotection, doivent être réalisées avant son éventuelle introduction sur le marché. Dans un premier temps, l'éventuelle production d'amines biogènes (toxiques) par cette souche au sein de la matrice devra être évaluée **(Coton *et al.,* 2018)**. La production de molécules antagonistes par la souche ne doit pas avoir d'impact négatif sur les propriétés organoleptiques des produits laitiers. Un ensemble d'analyses sensorielles devra donc ensuite être mis en place afin d'identifier une éventuelle altération du goût ou de la texture des produits comme réalisé par Delavenne et collaborateurs en 2015 et Ouiddir et collaborateurs en 2019. Pour finir, son génome devra être séquencé ce qui permettra d'y rechercher des gènes de résistance aux antibiotiques (notamment sur d'éventuel éléments mobiles tels que des plasmides) **(Coton *et al.,* 2018)** afin d'éviter qu'elle ne puisse servir de source de résistance.

C. Molécules antifongiques produites en challenge tests

Avec ou sans activité contre les cibles fongiques testées, les lactobacilles produisent dans leur milieu des molécules potentiellement antifongiques lors de leur développement **(Le Lay *et al.,* 2016)**. Ce constat a fait partie intégrante de la stratégie d'identification de molécules actives, et plus précisément de celles responsables de l'activité de la souche *L. casei* 7006 en challenge test. L'analyse des molécules antifongiques produites s'est directement axée sur la comparaison de métabolites produits par quatre souches de lactobacilles possédant une activité antifongique (*L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 et *L. zymae* 6188) avec ceux produits par deux souches inactives (*L. paracasei* 6363 et *L. casei* 6960). La caractérisation des molécules antifongiques est donc passée par la comparaison de celles présentes dans les matrices sans ou avec lactobacille (actif ou inactif). Les acides organiques produits au sein des matrices lactées ont ainsi été analysés. Les concentrations en acide lactique présent à 14 jours de stockage (et le pH induit)

étaient similaires pour chaque lait fermenté (~ 10 g/L), avec une augmentation constatée à 21 jours de stockage avec la souche *L. casei* 7006 (~ 13,7 g/L). Cependant, l'activité antifongique de cette souche était déjà la plus importante observée à 14 jours, ce qui indique que l'augmentation de concentration de cet acide n'était pas seule responsable de l'activité. Quatre autres acides organiques ont été détectés dans chaque matrice inoculée avec des lactobacilles : l'acide 2-hydroxyisocaproïque, l'acide phényllactique, l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxyphényllactique. Aucun lien entre ces quatre acides et l'activité n'a pu être établi puisque leur production était soit similaire entre les ferments actifs et inactifs, soit non corrélable à l'activité (les quantités d'acides phényllactique et hydroxyphényllactique produites par la souche inactive *L. casei* 6960 sont plus importantes que celles retrouvées dans un lait fermenté renfermant la souche active *L. casei* 7006). On peut noter cependant que l'ajout de lactobacilles a systématiquement entrainé la détection d'acide benzoïque dans les laits fermentés. Néanmoins, les quantités d'acide benzoïque produites étant similaires entre souches actives et inactives, son implication individuelle dans l'activité antifongique peut être écartée.

N'ayant à ce stade, pas réussi à identifier de molécule antifongique directement responsable des effets bioprotecteurs observés, la recherche d'autres molécules actives a donc été entreprise : peptides dérivés de la caséine **(Mcnair *et al.,* 2018)**, acides gras **(Bergsson *et al.,* 2001, Sjoren *et al.,* 2003, Ndagano *et al,* 2011, Black *et al.,* 2013, Liu *et al,* 2018)** et molécules volatiles **(Aunsbjerg *et al.,* 2015, Leyva Salas, 2018)**. Une matrice lactée inoculée avec la souche *L. casei* 7006 a montré une quantité plus élevée de diacétyle, qui a été par la suite quantifiée à 16 µg/mL. Sans aucune souche de lactobacille, le diacétyle est présent en lait fermenté à 1,8 µg/mL tandis qu'en présence de la souche *L. casei* 6960, cette molécule n'est plus détectée. Ces valeurs étaient du même ordre que celles obtenues avec ou sans souche active dans des yaourts lors de l'étude de Aunjsberg et collaborateurs en 2015. Dans cette étude, un stockage des yaourts réalisés avec le ferment *L. paracasei* DGCC 2132 a entrainé une augmentation du diacétyle à 13,5 +/- 0,54 mg/L contre 3,1 +/- 0,2 mg/L sans ce ferment. La présence de cette molécule avait été corrélée à l'inhibition de croissance de *Penicillium solitum* DCS 302 et *Penicillium* sp. nov. DSC 1541. Dans le lait fermenté contenant la souche *L. casei* 6960, on ne

constate pas la présence de diacétyle et la présence d'acétoïne est quasi nulle. L'acétoïne et le diacétyle sont deux précurseurs du 2,3-butanediol dont la quantité relative est plus importante dans un lait fermenté réalisé avec la souche *L. casei* 6960. Ce résultat laisserait supposer une conversion des deux précurseurs en 2,3-butanediol par la souche *L. casei* 6960.

Ainsi, l'activité élevée de la souche *L. casei* 7006 *L. casei* 7006 en challenge test pourrait être due à l'acide lactique (dont la concentration augmente lors du stockage à 7°C pendant 21 jours), agissant en synergie avec d'autres molécules produites par cette souche (comme l'acide benzoïque par exemple) et/ou à la production de diacétyle (environ 10 fois supérieure à la quantité retrouvée avec le ferment d'acidification seul) dans cette matrice.

D. Perspectives

1. Confirmation du rôle du diacétyle

La confirmation du rôle du diacétyle dans l'activité antifongique observée est actuellement en cours. Pour prouver son effet sur la souche de *C. lusitanaie* 3668, des tests de dopage par le diacétyle de la matrice lait fermenté sans ferment de biopréservation vont être réalisés à différentes concentrations dont la condition 16 µg/mL mesurée in situ. Si cette condition permet de retrouver une inhibition de croissance de *C. lusitaniae* 3668 similaire au lait fermenté contenant la souche *L. casei* 7006 ou au moins supérieur à celle du contrôle sans lactobacille, son effet à titre individuel serait confirmé. De même, la souche *L. rhamnosus* 5326 possède une activité intermédiaire en challenge test avec un abattement de la croissance de *C. lusitaniae* 3668 de 1,3 $\log_{10}$CFU/mL à 21 jours de stockage. La production de diacétyle par la souche *L. rhamnosus* 5326 pourrait être évaluée. Si la concentration en diacétyle retrouvée était inférieure à celle de la souche *L. casei* 7006 (16 mg/L) mais supérieure à celle du contrôle (1,8 mg/L), cela confirmerait l'implication de cette molécule dans l'activité.

L'industrie laitière s'intéresse de longue date à la production de diacétyle du fait des propriétés aromatiques de ce composé, amenant un goût de beurre, désirable dans certains produits comme les fromages, notamment le cheddar **(Clark and Winter, 2015; Curioni and Bosset, 2002)**. Sa production est liée en particulier

au métabolisme du citrate **(Hugenholtz *et al.,* 1993)** et a beaucoup été étudiée chez *Lactococcus lactis.* L'utilisation du citrate nécessite la perméase CitP*,* en permettant le transport intracellulaire, et l'opéron *citM-G* en permettant le catabolisme. Les souches possédant ces caractères génétiques constituent le variant *diacetylactis* **(Passerini *et al.,* 2013)**. La voie de synthèse du diacétyle et de l'acétoïne (Figure 6), chez la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264, est activée par la diminution du pH et aurait un rôle dans son homéostasie, à la fois en diminuant le stock de pyruvate et en synthétisant des composés neutres (diacétyle, acétoïne, 2,3-butanediol) **(Garcia-Quintans *et al.,* 2008)**. De nombreux articles relatent des stratégies de génie génétique visant à accroître la production de diacétyle en jouant sur les enzymes de cette voie. Ainsi, plusieurs travaux relatent l'inactivation de l' α-acétolactate décarboxylase, enzyme qui catalyse la décarboxylation de l'α-acétolactate en acétoïne **(Aymes *et al.,* 1999; Curic *et al.,* 1999)**. Le diacétyle provenant pour une grande partie de la décarboxylation spontanée de l'α-acétolactate en présence d'oxygène, cette mutation a conduit à l'accroissement de sa production. Cette recherche de mutants de l'α-acétolactate décarboxylase a également été conduite chez *Streptococcus thermophilus* **(Monnet and Corrieu, 2007)**. Les auteurs ont également conclu à une multiplication par 3 de la production de diacétyle par le mutant comparé à la souche sauvage, en aérobie ou anaérobie partielle. De plus, il a été montré que la présence de cette mutation dans un contexte génétique où l'activité lactate déshydrogénase (catalysant la transformation du pyruvate en lactate) était faible permettait encore d'accroître la quantité d'α-acétolactate et de diacétyle **(Monnet *et al.*, 2000)**, le flux métabolique serait donc orienté en faveur de la synthèse de l' α-acétolactate. Enfin, toujours dans un contexte où l' α-acétolactate décarboxylase est inactivée, une étude a montré que la surproduction de NADH oxydase en présence d'oxygène permettait également de réorienter le flux métabolique vers la synthèse d'α-acétolactate et de diacétyle, notamment en diminuant l'activité diacétyle réductase NADH dépendante **(Hugenholtz *et al.,* 2000)**.

Quant aux lactobacilles, une étude américaine de 1967 a montré la production de 6 µg/mL de diacétyle par les souches *L. casei* 393 et *L. casei* 334 dans du lait écrémé lors d'un stockage à 8°C pendant 21 jours **(Keenan and Lindsay, 1967)**.

L'inactivation de la L-lactate deshydrogénase (L-Ldh) dans ce modèle a également conduit à une production accrue du diacétyle chez la souche *L. casei* BL23 (20 fois supérieure) **(Viana *et al.,* 2005)**. Nadal et collaborateurs ont également montré que l'expression des gènes *ilvBN*, codant pour l'α-acétohydroxyacide synthase (ou α-acétolactate synthase, Als, catalyse la transformation du pyruvate en α-acétolactate) de *Lactococcus lactis,* conduisait à une augmentation d'environ 20 fois de la production de diacétyle par rapport au sauvage. Par ailleurs, cette quantité pouvait augmenter jusqu 'à 84 fois lorsque cette surexpression avait lieu dans un mutant *ldh* de la souche *L. casei* BL180 **(Nadal *et al.,* 2009)**.

En 2018, une équipe australienne a comparé les génomes de souches de lactobacilles faiblement et fortement productrices de diacétyle **(Lo *et al.,* 2018)**. La souche faiblement productrice *L. rhamnosus* ASCC 3016 présentait une Als tronquée : longueur de 193 acides aminés contre 558 chez les autres souches. La complémentation de ce gène au sein de la souche *L. rhamnosus* ASCC 3016 a permis de produire autant de diacétyle en matrice laitière que les souches les plus productrices, *L. rhamnosus* ASCC 3016 et *L. rhamnosus* ASCC 1521, en association avec un ferment d'acidification (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Ainsi, la deuxième possibilité permettant de vérifier l'implication dans l'activité antifongique de la production de diacétyle par la souche *L. casei* 7006 pourrait être la réalisation d'un mutant de délétion du gène *als*, suivie d'une complémentation. L'analyse de ces deux mutants en lait fermenté pourrait à la fois confirmer l'effet antifongique du diacétyle contre *C. lusitaniae* 3668 et sa production par la souche *L. casei* 7006. Ainsi, une surexpression du gène *als* et/ou la délétion du gène *ldh* pourraient être envisagées pour surproduire du diacétyle à la fois pour des raisons de biopréservation et un gain en termes de qualités organoleptiques.

2. Interactions intra et inter-espèces

La deuxième hypothèse quant à l'augmentation de la production de diacétyle ou d'autres composés antifongiques pourrait être liée à une stimulation positive exercée par la souche *L. casei* 7006 sur les deux souches du ferment d'acidification ou l'inverse.

L'association de plusieurs souches pour établir un ferment de biopréservation est décrite et présente un axe de recherche prometteur. En crème fraiche et en fromage cheddar, la souche *L. plantarum* L244 en association avec les souches *L. harbinensis* L172 ou *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 ont montré une activité plus importante que pour chacune de ces trois souches seules **(Salas *et al.,* 2018)**. D'autres études ont montré une meilleure activité en utilisant des cocultures de différentes souches de *L. paracasei* et de *Propionibacteirum jensenii* dans des yaourts **(Schwenninger and Meile, 2004)**. Cependant, dans ces études les molécules antifongiques responsables de l'activité n'ont pas été identifiées. Aussi, l'analyse d'association des différentes souches de lactobacilles sélectionnées dans cette étude pourrait être envisagée afin d'en augmenter l'activité au sein de lait fermenté.

La communication inter-espèces, notamment chez les lactobacilles est décrite. Des travaux récents traitant de la biopréservation de crevettes ont montré qu'une co-culture entre la souche *L. plantarum* AB-1 et une souche de *L. casei* permettait l'augmentation de l'activité antibactérienne contre *Shewanella baltica* en milieu MRS **(Li *et al.,* 2019)**. Cette augmentation de l'activité était corrélée à l'accroissement de la production d'une bactériocine, elle-même médiée par l'augmentation de la production de l'autoinducteur-2 (AI-2) en co-culture. AI-2 est une molécule de quorum sensing (QS) non spécifique, universelle parmi les bactéries et produite par l'enzyme LuxS **(Pereira *et al.,* 2013)**. La même équipe a suggéré un possible lien entre la surexpression du gène *luxS* et l'augmentation de la production d'acide phényllactique, donc en relation avec le QS **(Yang *et al.*, 2019)**. Ainsi, la présence de gènes impliqués dans un système de QS chez la souche *L. casei* 7006 pourrait être investiguée. De même, la présence d'AI-2 en lait fermenté, en présence ou non de la souche *L. casei* 7006 pourrait être recherchée. Si la présence de ces gènes et/ou de l'AI-2 est avérée, la création de mutants *ΔluxS* pourrait être réalisée. Ils seraient par la suite analysés pour voir si le quorum sensing intervient sur l'activité antifongique en lait fermenté.

La protéine LuxS est moins décrite chez *Lactococcus*. Cependant, une étude a montré que la baisse de pH induit fortement l'expression d'un homologue de *luxS* chez la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 **(Frees *et al.,* 2003)**. Si

cette souche possède des gènes inductibles à l'AI-2, une supplémentation de cette molécule pourrait être réalisée au sein de laits fermentés afin de démontrer une éventuelle augmentation de l'activité antifongique par le ferment d'acidification ou un ferment de biopréservation ajouté tel qu'un lactobacille.

3. Mise au point d'un criblage de souches surproductrices de molécules antifongiques

La quatrième partie de l'étude avait pour but d'obtenir des clones plus actifs à partir des souches de lactobacilles *L. rhamnosus* 5326 et *L. casei* 7006 par mutagénèse aléatoire. Le premier type de mutagénèse testé consistait en une approche physico-chimique par irradiation UV. La surproduction d'acide lactique par cette approche avait notamment été montrée par Joshi et son équipe en 2010 chez la souche *Lactobacillus lactis* NCIM 2368. Cependant, l'étape de criblage des éventuels mutants s'est révélée infructueuse du fait notamment des nombreuses contraintes techniques liées à la sensibilité de la méthode de détection et à sa reproductibilité. Les méthodes de criblage à haut débit (~5 000 interactions) permettent de mettre en évidence un effet positif ou négatif de l'activité sans pour autant l'estimer en utilisant des milieux de laboratoire comme le MRS **(Inglin *et al.*, 2015)**. Une méthode alternative de criblage dans une matrice mimant la composition d'un fromage a également été décrite récemment, permettant de s'affranchir des contraintes d'un milieu synthétique (~ 1600 essais par semaines) **(Garnier *et al.*, 2018)**. Cependant, ces méthodes ne sont pas applicables pour la recherche de mutants surproduisant des molécules actives à partir d'une souche présentant déjà une forte activité.

La souche *L. casei* 7006 a montré une production élevée de diacétyle, molécule antifongique et aromatique des produits laitiers, probablement liée à son activité. Une nouvelle méthode de criblage de mutants surproducteurs de cette molécule peut être envisagée. Une approche similaire a été mise au point lors d'un criblage de levures fortement productrices d'acétaldéhyde et de diacétyle **(Rosca *et al.*, 2016)**. Ainsi, des cultures en lait fermenté pourraient être réalisées en plaques 96 puits. La révélation de la production de diacétyle pourrait être réalisée par ajout de 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH), autrement appelé réactif de Brady. Ce réactif

réagit avec les fonctions cétones, notamment du diacétyle, et donne l'apparition d'une coloration jaune en fonction de la concentration. Ainsi, les mutants inoculés dans les laits fermentés possédant une coloration jaune plus soutenue que celle obtenue avec la souche sauvage pourraient être surproducteurs de diacétyle. Cette surproduction resterait à vérifier en SPME-GC-MS et l'activité antifongique à tester.

Contrairement à la mutagénèse UV, la mutagénèse par transposition n'avait pas vocation à conduire à l'isolement d'un mutant surproducteur applicable à l'‘industrie laitière, du fait notamment des limites de la législation concernant les OGM. Cette approche était souhaitée pour identifier des voies de production de molécules antifongiques, notamment grâce à l'obtention de mutants inactifs. Leur détection par les méthodes à haut débit décrites dans la littérature aurait alors été envisageable, notamment celle décrite par Inglin en 2015. Toutefois, la première difficulté rencontrée a été la transformation des souches de lactobacilles, celle-ci s'avérant inefficace avec plusieurs souches. Après l'utilisation de quatre approches différentes pour la transformation des cellules par le plasmide pVI129 **(Licandro-Serrault *et al.,* 2012)**, seule la souche *L. spicheri* 6187 avait été transformée. Cependant, l'étape suivante concernant l'élimination du plasmide pVI129, porteur de la transposase TpaseIS1223, s'était révélée infructueuse, entrainant donc une possible instabilité des mutants de transposition. Un autre système contenant un seul plasmide vecteur, le pPH-M1, a été envisagé **(Hemarajata *et al.,* 2014)**. La transformation de la souche *L. casei* 7006 par ce plasmide s'est cette fois ci révélée fructueuse. Les étapes suivantes concernant l'induction de la transposase Himar1C9 puis le curage du plasmide pPH1-M1 pour la génération d'une banque de mutants aléatoires sont en cours de réalisation. Le gène codant pour cette transposase est inductible par une dose subléthale de Nisine. Le curage du plasmide sera réalisé par deux cultures successives à 46°C.

VII - Références bibliographiques

Abbott, D.A., Knijnenburg, T.A., De Poorter, L.M.I., Reinders, M.J.T., Pronk, J.T., Van Maris, A.J.A.. (2007). Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 7, 819–833. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00242.x

AgenceBio (2018). Baromètre de consommation et de perception des produits biologiques en France

Alexandre, H., Mathieu, B., Charpentier, C. (1996). Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H(þ)-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology* 142, 469–475.

Andersson, R., Hedlund, B., (1983). HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Z Leb. Unters Forsch* 176, 440–443.

Arena, M.P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D., (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front. Microbiol*. 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00464

Arendrup, M.C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J.F., Cornely, O.A., Lortholary, O., Arikan-Akdagli, S., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., van Diepeningen, A.D., Groll, A.H., Guarro, J., Guinea, J., Hope, W., Lackner, M., Lass-Flörl, C., Lagrou, K., Lanternier, F., Meletiadis, J., Munoz, P., Pagano, L., Richardson, M.D., Roilides, E., Tortorano, A.M., Ullmann, A.J., (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin. Microbiol. Infect*. 20, 76–98. doi:10.1111/1469-0691.12360

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarrondo, M., Chobert, J.M., Dousset, X., Ivanova, I., Haertlé, T., (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced *by Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol*. 87, 63–73. doi:10.1016/S0168-1605(03)00054-0

Aunsbjerg, S., Andersen, K., Knøchel, S., (2015a). Real-time monitoring of fungal inhibition and morphological changes. *J. Microbiol. Methods* 119, 196–202. doi:10.1016/j.mimet.2015.10.024

Aunsbjerg, S., Honoré, A., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F., Benfeldt, C., Skov, T., Knøchel, S., (2015b). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol*. 194, 46–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007

Avis, T., Belanger, R., (2001). Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 956–960. doi:10.1128/AEM.67.2.956-960.2001

Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E.K., (2016). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol*. 239, 86–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006

Axel, C., Zannini, E., Arendt, E.K., Waters, D.M., Czerny, M.,(2014). Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay. *Anal. Bioanal. Chem*. 406, 2433–2444. doi:10.1007/s00216-014-7620-3

Axelsson, L., (1990). *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.

Aymes, F., Monnet, C., Corrieu, G., (1999). Effect of a-Acetolactate Decarboxylase Inactivation on a-Acetolactate and Diacetyl Production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *J. Biosci. Bioeng*. 87, 87–92.

Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C., (2007). Salivaricin p, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol*. 73, 3719–3723. doi:10.1128/AEM.00666-06

Bazukyan, I., Matevosyan, L., Toplaghaltsyan, A., Trchounian, A., (2018). Antifungal activity of *lactobacilli* isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature. *AMB Express* 8. doi:10.1186/s13568-018-0619-y

Beletsiotis, E., Ghikas, D., Kalantzi, K., (2012). Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: A case study. Procedia Food Sci. 1, 1051–1059. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.157

Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S., Tomita, M., (1994). Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol*. 18, 230–233. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00854.x

Bellio, A., Bianchi, D.M., Gramaglia, M., Loria, A., Nucera, D., Gallina, S., Gili, M., Decastelli, L., (2016). Aflatoxin M1 in cow's milk: Method validation for milk sampled in northern Italy. *Toxins* doi:10.3390/toxins8030057

Belz, M.C.E., Axel, C., Arendt, E.K., Lynch, K.M., Brosnan, B., Sheehan, E.M., Coffey, A., Zannini, E., (2019). Improvement of taste and shelf life of yeasted low-salt bread containing functional sourdoughs using *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 and *Weisella cibaria* MG1. *Int. J. Food Microbiol.* 302, 69–79. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.015

Bergsson, G., Arnfinnsson, A., Steingrimsson, O., Thormar, H., (2001). In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3209–3212. doi:10.1128/AAC.45.11.3209-3212.2001

Berthier, F., Zagorec, M., Champomier-verg, M., Ehrlich, D., Morel-devillel, F., (1996). Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology* 142, 1273–1279.

Bettenbrock, K., Alpert, C.A., (1998). The gal genes for the leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2013–2019.

Black, B.A., Sun, C., Zhao, Y.Y., Gänzle, M.G., Curtis, J.M., (2013a). Antifungal lipids produced by *lactobacilli* and their structural identification by normal phase LC/atmospheric pressure photoionization-MS/MS. *J. Agric. Food Chem*. 61, 5338–5346. doi:10.1021/jf400932g

Black, B.A., Zannini, E., Curtis, J.M., Gänzle, M.G., (2013b). Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. *Appl. Environ. Microbiol*. 79, 1866–1873. doi:10.1128/AEM.03784-12

Bosma, E.F., Forster, J., Nielsen, A.T., (2017). *Lactobacilli* and *Pediococci* as versatile cell factories – Evaluation of strain properties and genetic tools. *Biotechnol. Adv. 35*, 419–442. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.04.002

Branen, A.L., Keenan, T.W., (1971). Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei. Appl. Microbiol*. 22, 517–21.

Branger, A., Richer, M., Roustel, S., (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques, *Éducagri éditions*. Dijon.

Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K., Schnürer, J., (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl. Environ. Microbiol*. 73, 5547–5552. doi:10.1128/AEM.02939-06

Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E.K., Furey, A., (2014). A comprehensive investigation into sample extraction and method validation for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria using HPLC-UV/DAD. *Anal. Methods 6*, 5331. doi:10.1039/c3ay42217h

Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E.K., Furey, A., (2012). Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Anal. Bioanal. Chem*. 403, 2983–2995. doi:10.1007/s00216-012-5955-1

Buehler, A.J., Evanowski, R.L., Martin, N.H., Boor, K.J., Wiedmann, M., (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *J. Dairy Sci.* 100, 8814–8825. doi:10.3168/jds.2017-12635

Buňková, L., Buňka, F., Mantlová, G., Čablová, A., Sedláček, I., Švec, P., Pachlová, V., Kráčmar, S., (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol*. 27, 880–888. doi:10.1016/j.fm.2010.04.014

Carmelo, V., Santos, H., Sá-Correia, I., (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*. *1325*, 63–70. doi:10.1016/S0005-2736(96)00245-3

Carreira, A., Ferreira, L., Loureiro, V., (2001). Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol*. 90, 372–379. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01256.x

Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria*. Lait* 83, 203–210. doi:10.1051/lait

Cassio, F., Leao, C., Van Uden, N., (1987). Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ-mental Microbiol.* 53, 509–513.

Catellani, P., Miotti Scapin, R., Alberghini, L., Radu, I.L., Giaccone, V., (2014). Levels of microbial contamination of domestic refrigerators in Italy. *Food Control* 42, 257–262. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.025

Chaudhari, S., (2016). Phenyllactic Acid: A Potential Antimicrobial Compound in Lactic acid Bacteria. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access* 2, 121–125. doi:10.15406/jbmoa.2016.02.00037

Chaumont, J., Simeray, J., Mandin, D., Adessi, B., (2001). Moisissures et allergies des professions agricoles et de l'agroalimentaire. *Rev. Française d'Allergologie d'Immunologie Clin.* 41, 253–256. doi:10.1016/s0335-7457(01)00031-4

Chen, L., Gu, Q., Li, P., Li, Y., Song, D., Yang, J., (2018). Purification and Characterization of Plantaricin ZJ316, a Novel Bacteriocin *against Listeria monocytogenes* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *J. Food Prot*. 81, 1929–1935. doi:10.4315/0362-028x.jfp-18-306

Cheong, E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielehner, J., Bansal, N., Turner, M.S., (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46, 91–97. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.011

Chipley, J., (2005). Antimicrobials in foods, in: Davidson, P., Sofos, J., Branen, A., *Food Research International. Francis & Taylor*, pp. 11–48. doi:10.1016/0963-9969(94)90184-8

Christieans, S., Delbes-Paus, C., Denis, C., Montel, M., Prévost, H., Rivollier, M., Stahl, V., (2013). Mécanismes d'action, chapitre 2 : Flores protectices pour la conservation des aliments. Versailles, pp. 19–44.

Chuang, L.F., Collins, E.B., (1968). Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. *J. Bacteriol*. 95, 2083–2089.

Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., (1989). in Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus Reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis*. 2, 137–144. doi:10.3109/08910608909140211

Clark, S., Winter, C.K., (2015). Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 14, 634–643. doi:10.1111/1541-4337.12150

CNIEL, (2019). La filière laitière française http://www.filiere-laitiere.fr/fr

Collins, F.W.J., O'Connor, P.M., O'Sullivan, O., Gómez-Sala, B., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P., (2017). Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete *Lactobacillus* Pan-genome. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-03339-y

Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L., Zambonelli, C., (2007). Antifungal activity of *lactobacilli* isolated from salami. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 245–250. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00723.x

Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M., (2001). Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 147–152. doi:10.1016/S0168-1605(01)00585-2

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. doi:10.1007/s002530051285

Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., García, H.S., (2014). Antifungal activity of *lactobacilli* and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 30–35. doi:10.1016/ j.ijfoodmicro.2013.12.016

Coton, M., Lebreton, M., Leyva Salas, M., Garnier, L., Navarri, M., Pawtowski, A., Le Blay, G., Valence, F., Coton, E., Mounier, J., (2018). Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. *Int. Dairy J.* 85, 21–26. doi:10.1016/j.idairyj.2018.05.001

Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004

Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., (2012). Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. *J. Appl. Microbiol*. 113, 1417–1427. doi:10.1111/jam.12012

Cruess, W., Richert, P., (1929). Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. *J. Bacteriol* 17, 363.

Curic, M., de Richelieu, M., Henriksen, C., (1999). Glucose/citrate cometabolisme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* with impaired alpha-acetolactate decarboxylase*. Metab. Eng.* 1, E17–E24.

Curioni, P.M.G., Bosset, J.O., (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry*. Int. Dairy J*. 12, 959–984. doi:10.1016/S0958-6946(02)00124-3

Dahl, S., Mortensen, J., Rasmussen, K., (1994). Cheese-packers' disease--respiratory complaints at a cheese-packing dairy. *Ugeskr Laeger* 156, 5862–5.

Dao, Y., Zhang, K., Lu, X., Lu, Z., Liu, C., Liu, M., Luo, Y., (2019). Role of Glucose and 2-Oxoglutarate/Malate Translocator (OMT1) in the Production of Phenyllactic Acid and p-Hydroxyphenyllactic Acid, Two Food-Borne Pathogen Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 67, 5820–5826. doi:10.1021/acs.jafc.9b01444

De Keersmaecker, S.C.J., Braeken, K., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Hols, P., (2006). Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for response to defensins. *Appl. Environ. Microbiol*. 72, 4923–4930. doi:10.1128/AEM.02605-05

De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., (1960). A medium used for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 23, 130–135. doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

De Santi, M., Sisti, M., Barbieri, E., Piccoli, G., Brandi, G., Stocchi, V., (2010). A combined morphologic and molecular approach for characterizing fungal microflora from a traditional Italian cheese (Fossa cheese). *Int. Dairy J.* 20, 465–471. doi:10.1016/j.idairyj.2010.02.004

Deepthi, B., Rao, K., Chennapa, G., Naik, M., Chandrashekara, K., Sreenivasa, M., (2016). Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. *PLoS One* 11, 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0155122

Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J., Le Blay, G., (2015). Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiol.* 45, 10–17. doi:10.1016/j.fm.2014.04.017

Denis, C., Champomier-verges, M., Zagorec, M., Talon, R., Michel, V., (2013). Critères de sélection des micro-organismes bioprotecteurs, chapitre 1 : Flores protectices pour la conservation des aliments. Versailles, pp. 7–17.

Eklund, T., (1989). Organic acids and esters. *Elsevier*, New York 161–200.

Eklund, T., (1980). Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J. Bacteriol*. 48, 423–432.

El-Gendy, S.M., Abdel-Galil, H., Shanin, Y., Hegazi, F.Z., (2016). Acetoin and Diacetyl Production by *Lactobacillus plantarum* Able to Use Citrate. *J. Food Prot.* 46, 503–505. doi:10.4315/0362-028x-46.6.503

Escalon, H., Baudier, F., Beck, F., Bocquier, A., Bossard, C., Darmon, N., Delamaire, C., Gautier, A., Grange, D., Guignard, R., Guillemont, J., Julia, C., Lambert, J.-L., Le Bihan, G., Léon, C., Lydié, N., Michaud, C., Poulain, J.-P., Ruiz, I., Trugeon, A., Vincelet, C., (2008). Baromètre santé nutrition 2008

Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., Cosentino, S., (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese*. Int. J. Food Microbiol.* 95, 51–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001

Fadda, M.E., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M.B., Cosentino, S., (2010). Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia*. Int. J. Food Microbiol.* 136, 376–380. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.007

Falguni, P., Shilpa, V., Mann, B., (2010). Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02*. Int. J. Dairy Technol.* 63, 70–76. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00553.x

FAO, (2019). Codex alimentarius http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/fr/

FDA, Generally Recognized As Safe (GRAS) (2019). https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-food-feeds/generally-recognized-safe-gras-notification-program

Fernandes, A.R., Mira, N.P., Vargas, R.C., Canelhas, I., Sá-Correia, I., (2005). *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 95–103. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.010

Fernandes, K.E., Carter, D.A., (2017). The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: Mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.00002

Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., (1996). Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 85–102. doi:10.1016/0168-1605(96)01153-1

Frees, D., Vogensen, F.K., Ingmer, H., (2003). Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis. Int. J. Food Microbiol*. 87, 293–300. doi:10.1016/S0168-1605(03)00104-1

Freese, (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241, 321–325.

Frey, P., (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J* 10, 461–470.

García-Quintáns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., López, P., (2008). Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1988–1996. doi:10.1128/AEM.01851-07

Garnier, L., Salas, M.L., Pinon, N., Wiernasz, N., Pawtowski, A., Coton, E., Mounier, J., Valence, F., (2018). Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *J. Dairy Sci*. 101, 4971–4976. doi:10.3168/jds.2017-13518

Garnier, L., Valence, F., Mounier, J., (2017a). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* 5, 42. doi:10.3390 /microorganisms5030042

Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerne, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., (2017b). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 191–197. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026

Gerez, C.L., Torres, M.J., Font de Valdez, G., Rollán, G., (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control* 64, 231–237. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.10.009

Gifford, J.L., Hunter, H.N., Vogel, H.J., (2005). Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2588–2598. doi:10.1007/s00018-005-5373-z

Gong, H.S., Meng, X.C., Wang, H., (2010). Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella typhimurium*. *J. Basic Microbiol*. 50, 37–45. doi:10.1002/jobm.201000130

Goodman, L.B., Lawton, M.R., Franklin-guild, R.J., Anderson, R.R., Schaan, L., Thachil, A.J., Wiedmann, M., Miller, C.B., Alcaine, S.D., Kovac, J., 2017. Lactococcus petauri sp . nov ., isolated from an abscess of a sugar glider 4397–4404. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002303

Guimarães, A., Venancio, A., Abrunhosa, L., (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on Penicillium nordicum. Food Addit. Contam. - Part A *Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 35, 1803–1818. doi:10.1080/19440049.2018.1500718

Gulbe, G., Valdovska, A., (2014). Diversity of Microscopic Fungi in the Raw Milk from Latvian Organic Farms. *Proc. Latv. Univ. Agric*. 31, 46–53. doi:10.2478/plua-2014-0006

Guo, J., Mauch, A., Galle, S., Murphy, P., Arendt, E.K., Coffey, A., (2011). Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.* 111, 474–483. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05032.x

Gupta, R., Srivastava, S., (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol.* 42, 1–7. doi:10.1016 /j.fm.2014.02.005

Haastrup, M.K., Johansen, P., Malskær, A.H., Castro-Mejía, J.L., Kot, W., Krych, L., Arneborg, N., Jespersen, L., (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *Int. J. Food Microbiol*. 285, 173–187. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.015

Han, N., Park, S.-Y., Kim, S.-Y., Yoo, M.-Y., Paik, H.-D., Lim, S.-D., (2016). Short communication: Change of naturally occurring benzoic acid during skim milk fermentation by commercial cheese starters. *J. Dairy Sci*. 99, 8633–8637. doi:10.3168/jds.2016-10890

Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Seymour, I., Bauer, B.E., Krapf, G., Schüller, C.,

Kuchler, K., Piper, P.W., (2003). Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter*. Yeast* 20, 575–585. doi:10.1002/yea.981

Hazan, R., Levine, A., Abeliovich, H., (2004). Benzoic Acid, a Weak Organic Acid Food Preservative, Exerts Speci c Effects on Intracellular Membrane Trafficking Pathways in *Saccharomyces cerevisiae. Appl environ microbiol* 70, 4449–4457. doi:10.1128/AEM.70.8.4449

Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y., (2009). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol. 138, 2725–2731. doi:10.1099/00221287-138-12-2725

Hemarajata, P., Spinler, J., Balderas, M., Versalovic, J., (2014). Identification of a Proton-Chloride Antiporter (EriC) by Himar1 Transposon Mutagenesis in *Lactobacillus reuteri* and Its Role in Histamine Production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 579–592. doi:10.1007/s10482-014-0113-8

Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14, 467–494. doi:10.1016/j.idairyj.2003.10.005

Henriques, S.F., Mira, N.P., Sá-Correia, I., (2017). Genome-wide search for candidate genes for yeast robustness improvement against formic acid reveals novel susceptibility (Trk1 and positive regulators) and resistance (Haa1-regulon) determinants. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–12. doi:10.1186/s13068-017-0781-5

Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fremaux, C., Berjeaud, J.M., (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat*. Int. J. Food Microbiol.* 113, 67–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.016

Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M.J., Villalobos, M.C., Martín, A., Córdoba, M.G., (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *Int. J. Food Microbiol*. 286, 98–110. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031

Holyoak, C.D., Bracey, D., Piper, P.W., Kuchler, Karl, Coote, P.J., Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P., Kuchler, K, (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Weak-Acid-Inducible ABC Transporter Pdr12 Transports Fluorescein and Preservative Anions from the Cytosol by an Energy-Dependent Mechanism. *J. Bacteriol.* 181, 4644–4652.

Holzapfel, W., Wood, B., (1995). The Genera of Lactic Acid Bacteria, Springer S. ed,. doi:10.1007/978-1-4615-5817-0

Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W., Hols, P., (2000). *Lactococcus lactis* as a Cell Factory for High-Level Diacetyl. *Appl environ microbiol* 66, 4112–4114.

Hugenholtz, J., Perdon, L., Abee, T., (1993). Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol*. 59, 4216–4222.

Inglin, R.C., Stevens, M.J.A., Meile, Lukas, Lacroix, C., Meile, Leo, (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114, 26–29. doi:10.1016/ j.mimet.2015.04.011

Joshi, D.S., Singhvi, M.S., Khire, J.M., Gokhale, D. V., (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for d-lactic acid production. *Biotechnol. Lett.* 32, 517–520. doi:10.1007/s10529-009-0187-y

Katla, T., Møretrø, T., Sveen, I., Aasen, I., Rørvik, L., Naterstad, K., (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J. Appl. Microbiol.* 93, 191–196. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01675.x

Keenan, T.W., Lindsay, R.C., (1967). Diacetyl Production and Utilization by *Lactobacillus* Species. *J. Dairy Sci.* 51, 188–191. doi:10.3168/jds.s0022-0302(68)86948-6

Kim, S.S., Bhowmik, S.R., (1990). Survival of Lactic Acid Bacteria during Spray Drying of Plain Yogurt. *J. Food Sci.* 55, 1008–1010. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01585.x

Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P.S., Fernández Escámez, P.S., Maradona, M.P., Querol, A., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlak, J., Barizzone, F., Correia, S., Herman, L., (2019). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 9: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2018. *EFSA J.* 17, 1–46. doi:10.2903/j.efsa.2019.5555

Kulozik, U., Wilde, J., (1999). Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus. Enzyme Microb. Technol.* 24, 297–302. doi:10.1016/S0141-0229(98)00122-7

Kure, C.F., Borch, E., Karlsson, I., Homleid, J.P., Langsrud, S., (2008). Use of the selective agar medium CREAD for monitoring the level of airborne spoilage moulds in cheese production. *Int. J. Food Microbiol*. 122, 29–34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.060

Kure, C.F., Skaar, I., Brendehaug, J., (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 41–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.005

Kwak, M.-K., Liu, R., Kim, M.-K., Moon, D., HyoungJin Kim, A., Song, S.-H., Kang, S.-O., (2014). Cyclic Dipeptides from Lactic Acid Bacteria Inhibit the Proliferation of Pathogenic Fungi*. J. Microbiol.* 52, 64–70. doi:10.1007/s12275-014-3520-7

Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J., Karpíšková, R., (2017). Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 0. doi:10.1007/s11274-017-2354-y

Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A., (2012). front: Microbiological and functional aspects. *Fourth Edition*

Landete, J.M., Arqués, J.L., Peirotén, Á., Langa, S., Medina, M., (2014). An improved method for the electrotransformation of lactic acid bacteria: A comparative survey. *J. Microbiol. Methods* 105, 130–133. doi:10.1016/j.mimet.2014.07.022

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084–4090. doi:10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000

Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A., (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products*. Appl. Environ. Microbiol.* 69, 634–640. doi:10.1128/AEM.69.1.634-640.2003

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.* 92, 455–468. doi:10.1007/s13594-011-0051-4

Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.M., Haertlé, T., Choiset, Y., Van Long, N.N., Meslet-Cladière, L., Mounier, J., (2016) Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria*. Int. J. Food Microbiol.* 239, 79–85. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020

Leistner, L., (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol*, 55(1-3), 181–186.

Leon Peláez, L.A.M., Serna Cataño, C.A., Quintero Yepes, E.A., Gamba Villarroel, R.R., De Antoni, G.L., Giannuzzi, L., (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation*. Food Control* 24, 177–183. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.024

Leuschner, R.G.K., Kurihara, R., Hammes, W.P., (1998). Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by *Lactobacilli* during Gouda cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol*. 44, 15–20. doi:10.1016/S0168-1605(98)00118-4

Leyva Salas, M., (2018). Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection , évaluation à l ' échelle pilote et identification de composés supports de l'activité. Thèse: HAL Id : tel-02080. Université de Bretagne occidentale, France.

Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 5, 37. doi:10.3390/microorganisms5030037

Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., Lv, J., (2013). Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control* 34, 675–680. doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.023

Li, J., Yang, X., Shi, G., Chang, J., Liu, Z., Zeng, M., (2019). Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp. *Food Res. Int.* 120, 679–687. doi:10.1016/ j.foodres.2018.11.025

Li, X., Jiang, B., Pan, B., (2007). Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 29, 593–597. doi:10.1007/s10529-006-9275-4

Licandro-Seraut, H., Brinster, S., van de Guchte, M., Scornec, H., Maguin, E., Sansonetti, P., Cavin, J.-F., Serror, P., (2012). Development of an efficient in vivo system (Pjunc-TpaseIS1223) for random transposon mutagenesis of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol*. 78, 5417–23. doi:10.1128/ AEM.00531-12

Liew, W.P.P., Nurul-Adilah, Z., Than, L.T.L., Mohd-Redzwan, S., (2018). The binding efficiency and interaction of *Lactobacillus casei* Shirota toward aflatoxin B1. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2018.01503

Lind, H., Jonsson, H., Schnürer, J., (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria - Contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol*. 98, 157–165. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.020

Lipińska, L., Klewicki, R., Sójka, M., Bonikowski, R., Żyżelewicz, D., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., (2018). Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10, 186–200. doi:10.1007/s12602-017-9344-0

Liu, Q., Lindow, S.E., Zhang, J., (2018). *Lactobacillus parafarraginis* ZH1 producing anti-yeast substances to improve the aerobic stability of silage. *Anim. Sci. J*. 89, 1302–1309. doi:10.1111/asj.13063

Lo, R., Ho, V.T.T., Bansal, N., Turner, M.S., (2018). The genetic basis underlying variation in production of the flavour compound diacetyl *by Lactobacillus rhamnosus* strains in milk. *Int. J. Food Microbiol*. 265, 30–39. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.029

Luz, C., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Ritieni, A., Mañes, J., Meca, G., (2018). Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey fermented by different strains of *Lactobacillus plantarum. Food Funct.* 9, 3688–3697. doi:10.1039/c8fo00535d

Luz, C., Saladino, F., Luciano, F.B., Mañes, J., Meca, G., (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. LWT - *Food Sci. Technol.* 81, 128–135. doi:10.1016/j.lwt.2017.03.053

Magnusson, J., Schnürer, J., (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70–78. doi:10.1016/ J.TIFS.2004.02.014

Magnusson, J., Schnürer, J., (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. c*oryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol*. 67, 1–5. doi:10.1128/AEM.67.1.1-5.2001

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J., (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129–135. doi:10.1016/S0378-1097(02)01207-7

Mannion, D.T., Furey, A., Kilcawley, K.N., (2016). Free fatty acids quantification in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* 69, 1–12. doi:10.1111/1471-0307.12301

Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A., Arendt, E.K., (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. J. Food Microbiol*. 141, 116–121. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.002

Mcauliffe, O., 2018. Symposium review : Lactococcus lactis from nondairy sources : Their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese 1. J. Dairy Sci. 101, 3597–3610. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13331

Mcnair, L.F., Vinther, J.M., Hansen, A.M., Neves, A.R., Jäger, A.K., Franzyk, H., Stærk, D., (2018). Identification and characterisation of a novel antifungal peptide in fermented milk product containing first-generation bioprotective LAB cultures. *FEMS Yeast Res*. 18, 1–25. doi:10.1093/femsyr/foy094/5078347

Medina de Figueroa, R., Oliver, G., Benito de Cárdenas, I.L., (2001). Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Microbiol. Res*. 155, 257–262. doi:10.1016/S0944-5013(01)80002-1

Mira, N.P., Lourenço, A.B., Fernandes, A.R., Becker, J.D., Sá-Correia, I., (2009). The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res.* 9, 202–216. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00473.x

Mira, N.P., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I., (2010). Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae* : A Genome-Wide View . *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 525–540. doi:10.1089/omi.2010.0072

Mollapour, M., Piper, P.W., (2007). Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis, Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6446–6456. doi:10.1128/mcb.02205-06

Monnet, C., Aymes, F., Corrieu, G., (2000). Diacetyl and α-acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in α-acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5518–5520. doi:10.1128/AEM.66.12.5518-5520.2000

Monnet, C., Corrieu, G., (2007). Selection and properties of α-acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus. Food Microbiol*. 24, 601–606. doi:10.1016/j.fm.2007.01.004

Mu, W., Yang, Y., Jia, J., Zhang, T., Jiang, B., (2010). Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007 fermentation. *J. Biosci. Bioeng*. 109, 369–371. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.10.005

Muhialdin, B.J., Hassan, Z., Bakar, F.A., Saari, N., (2016). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* 59, 27–30. doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.022

Muhialdin, B.J., Hassan, Z., Sadon, S.K., (2011). Antifungal Activity *of Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasei* D5 on Selected Foods. *J. Food Sci*. 76, 493–499. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x

Nadal, I., Rico, J., Pérez-Martínez, G., Yebra, M.J., Monedero, V., (2009). Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1233–1237. doi:10.1007/s10295-009-0617-9

Narendranath, N., Thomas, K., Ingledew, W., (2001a). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 171–177. doi:10.1038/sj.jim.7000090

Narendranath, N., Thomas, K., Michael, W., Narendranath, N., Thomas, K., Ingledew, W., (2001b). Acetic Acid and Lactic Acid Inhibition of Growth of *Saccharomyces cerevisiae* by Different Mechanisms. *Journal of the American Society of Brewing Chemists.* 59, 187-194. doi:10.1094/ASBCJ-59-0187

Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., Thonart, P., (2011). Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from *Food. J. Food Sci.* 76. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x

Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 86, 29–35. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00632.x

Nomura, T., Narahara, H., Tokumoto, H., Konishi, Y., (2009). The role of microbial surface properties and extracellular polymer in *Lactococcus lactis* aggregation. *Adv. Powder Technol*. 20, 537–541. doi:10.1016/j.apt.2009.07.003

Novick, R., (1987). Plasmid Incompatibility. *Microbiol. Rev*. 51, 381–395.

Ohta, T., Park, B., Aihara, M., Ri, N., Saito, T., Sawada, T., Takatori, K., (2006). Morphological significance of *Cladosporium* contaminants on materials and utensils in contact with food. *Biocontrol Sci.* 11, 55–60.

Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.J., (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbio*l. 87, 726–734. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00918.x

Orla-Jensen, S., (1919). The Lactic Acid Bacteria, *Andr. Fred. ed. Copenhagen*.

Ortiz-Rivera, Y., Sánchez-Vega, R., Gutiérrez-Méndez, N., León-Félix, J., Acosta-Muñiz, C., Sepulveda, D.R., (2017). Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci*. 100, 4258–4268. doi:10.3168/jds.2016-11534

Otu-bassey, I.B., Ewaoche, I.S., Okon, B.F., Ibor, U.A., (2017). Microbial Contamination of House Hold Refrigerators in Calabar Metropolis-Nigeria *American Journal of Epidemiology and Infectious Disease*. 5, 1-7. doi:10.12691/ajeid-5-1-1

Ouiddir, M., Bettache, G., Leyva Salas, M., Pawtowski, A., Donot, C., Brahimi, S., Mabrouk, K., Coton, E., Mounier, J., (2019). Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiol*. 82, 160–170. doi:10.1016/j.fm.2019.01.020

Palma, M., Dias, P.J., Roque, F. de C., Luzia, L., Guerreiro, J.F., Sá-Correia, I., (2017.) The *Zygosaccharomyces bailii* transcription factor Haa1 is required for acetic acid and copper stress responses suggesting subfunctionalization of the ancestral bifunctional protein Haa1/Cup2. *BMC Genomics* 18, 1–22. doi:10.1186/s12864-016-3443-2

Palma, M., Guerreiro, J.F., Sá-Correia, I., (2018). Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A physiological genomics perspective. *Front. Microbiol.* 9, 1–16. doi:10.3389/ fmicb.2018.00274

Palma, M., Roque, F. de C., Guerreiro, J.F., Mira, N.P., Queiroz, L., Sá-Correia, I., (2015). Search for genes responsible for the remarkably high acetic acid tolerance of a *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecies hybrid strain. *BMC Genomics* 16, 1–17. doi:10.1186/s12864-015-2278-6

Palomino, M.M., Allievi, M.C., Prado-Acosta, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S.M., (2010). New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt. *J. Microbiol. Methods* 83, 164–167. doi:10.1016/j.mimet.2010.08.017

Park, H., Jun, S., Han, K., Hong, S., Yu, J., (2017). Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv. Appl. Microbiol*. 100, 161–202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001

Park, S.Y., Yoo, M.Y., Paik, H.D., Lim, S.D., (2017). Production of benzoic acid as a natural compound in fermented skim milk using commercial cheese starter. *J. Dairy Sci*. 100, 4269–4275. doi:10.3168/jds.2016-12399

Passerini, D., Laroute, V., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Cocaign-Bousquet, M., Daveran-Mingot, M.L., (2013). New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 329–336. doi:10.1016/ j.ijfoodmicro.2012.10.023

Penney, V., Henderson, G., Blum, C., Johnson-Green, P., (2004). The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 369–375. doi:10.1016 /j.ifset.2003.10.006

Pereira, C.S., Thompson, J.A., Xavier, K.B., (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol*. Rev. 37, 156–181. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x

Perrone, G., Susca, A., (2017). *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins 1542, 107–119. doi:10.1007/978-1-4939-6707-0

Piard, J., Desmazeaud, M., (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71, 525–541.

Piper, P., Mahé, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P., Kuchler, K., (1998). The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* 17, 4257–4265. doi:10.1093/emboj/17.15.4257

Piper, P., Ortiz Calderon, Hatzixanthis, K., Mollapour, M., (2001). Weak acid adaptation: The stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147, 2635–2642. doi:10.1099/00221287-147-10-2635

Piper, P.W., (2011). Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives. *Adv. Appl. Microbiol*. 77, 97–113. doi:10.1016/B978-0-12-387044-5.00004-2

Pitt, J., Hocking, A., (2009). Fungi and food spoilage, *third. ed. Springer US.* doi:10.1007/978-0-387-92207-2

Polo, L., Lázaro, R.M., Olmeda, I., Cruz-Pio, L.E., Medina, Á., Ferrer, S., Pardo, I., (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *J Appl Microbiol* 122, 1603–1614. doi:10.1111/jam.13465

Poornachandra Rao, K., Deepthi, B., Rakesh, S., Ganesh, T., Achar, P., Sreenivasa, M.Y., (2017). Antiaflatoxigenic Potential of Cell-Free Supernatant from *Lactobacillus plantarum* MYS44 Against *Aspergillus parasiticus. Probiotics Antimicrob. Proteins* 1–10. doi:10.1007/s12602-017-9338-y

Porto, M.C.W., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M., Oliveira, R.P.S., (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol. Adv.* 35, 361–374. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.03.004

Posno, M., Leer, R.J., Van Luijk, N., Van Giezen, M.J.F., Heuvelmans, P.T.H.M., Lokman, B.C., Pouwels, P.H., (1991). Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl. Environ. Microbiol*. 57, 1822–1828.

Quattrini, M., Bernardi, C., Stuknytė, M., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., Vallone, L., De Noni, I., Brasca, M., Fortina, M.G., (2018). Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Res. Int*. 106, 936–944. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.074

Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M.G., Xiang, S., Curtis, J.M., Gänzle, M., (2019). Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. Int. J. Food Microbiol. 302, 8–14. doi:10.1016/ j.ijfoodmicro.2018.09.007

Règlement (CE) n°178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 1–42.

Réglement (UE) 2018/98 de la comission du 22 janvier, 2018. modifiant les annexes II et III du Règlement (UE) n°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil et l'annexe du règlement (UE) n°231/2012 de la Commission en ce qui concerne le sorbate de calcium (E 203).

Réglement (UE) n°1129/2011 du 11 novembre 2011, modifiant l'annexe II du règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires. doi:https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:FR:PDF

Régulation (EC) N°401/2006 du 23 février, 2006, 2006. The Commission of the European Communities Commission Regulation, EC. Off. J. Eur. Commun 70, 12_34.

Revol-Junelles, A., Mathis, R., Krier, F., Fleury, A., Delfour, A., Lefebvre, G., (1996). *Leuconostoc mesenteroides* su bsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins*. Lett. Appl. Microbiol.* 23, 120–124. doi:10.1111/j.1472-765X.1996.tb00045.x

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Cocconcelli, P.S., Klein, G., Prieto Maradona, M., Querol, A., Peixe, L., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlak, J.M., Aguilera-Gómez, M., Barizzone, F., Brozzi, R., Correia, S., Heng, L., Istace, F., Lythgo, C., Fernández Escámez, P.S., (2017). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J*. 15. doi:10.2903/j.efsa.2017.4664

Rodrigues, F., Zeeman, A.M., Cardoso, H., Sousa, M.J., Steensma, H.Y., Côrte-Real, M., Leão, C., (2004). Isolation of an acetyl-CoA synthetase gene (ZbACS2) from *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast* 21, 325–331. doi:10.1002/yea.1081

Rosca, I., Petrovici, A.R., Brebu, M., Stoica, I., Minea, B., Marangoci, N., (2016). An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 949–954. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.005

Ryan, L.A.M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., Arendt, E.K., (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 276–283. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036

Ryu, E.H., Yang, E.J., Woo, E.R., Chang, H.C., (2014). Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol.* 41, 19–26. doi:10.1016/j.fm.2014.01.011

Salas, M.L., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., Coton, E., (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. *Front. Microbiol*. 9, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2018.01787

Salustiano, V.C., Andrade, N.J., Cardoso Brandão, S.C., Cordeiro Azeredo, R.M., Kitakawa Lima, S.A., (2003). Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. Brazilian *J. Microbiol*. 34, 255–259. doi:10.1590/S1517-83822003000300015

Schillinger, U., Villarreal, J.V., (2010). Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21, 107–111. doi:10.1016/j.foodcont.2008.11.010

Schmidt, M., Lynch, K.M., Zannini, E., Arendt, E.K., (2018). Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. *Food Control* 88, 139–148. doi:10.1016/j.foodcont.2017.11.041

Schwenninger, S.M., Meile, L., (2004). A Mixed Culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Inhibits Food Spoilage Yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 229–237. doi:10.1078/072320204322881853

Sellamani, M., Kalagatur, N.K., Siddaiah, C., Mudili, V., Krishna, K., Natarajan, G., Rao Putcha, V.L., (2016). Antifungal and zearalenone inhibitory activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy products on *Fusarium graminearum. Front. Microbiol*. 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.00890

Sharma, A., Srivastava, S., (2014). Anti-*Candida* activity of spent culture filtrate of *Lactobacillus plantarum* strain LR/14. *J. Mycol. Med.* 24, e25–e34. doi:10.1016/j.mycmed.2013.11.001

Sheu, C., Salomon, D., Simmons, J.L., Sreevalsan, T., Freese, E., (1975). Inhibitory effect of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 349–363.

Sieber, R., Bütikofer, U., Bosset, J.O., (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Int. Dairy J.* 5, 227–246. doi:10.1016/0958-6946(94)00005-A

Siedler, S., Balti, R., Neves, A.R., (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Curr. Opin. Biotechnol.* 56, 138–146. doi:10.1016/j.copbio.2018.11.015

Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J., (2002). Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6416–6420. doi:10.1128/AEM.68.12.6416-6420.2002

Simon, X., Duquenne, P., (2014). Assessment of workers' exposure to bioaerosols in a French cheese factory. *Ann. Occup. Hyg.* 58, 677–692. doi:10.1093/ annhyg/meu027

Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J., Kenne, L., (2003). Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7554–7557. doi:10.1128/AEM.69.12.7554–7557.2003

Smedman, A.E.M., Gustafsson, I.-B., Berglund, L.G.T., Vessby, B.O.H., (1999). Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: Relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am. J. Clin. Nutr*. 69, 22–29.

Smit, B.A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M., Smit, G., (2004). Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 64, 396–402. doi:10.1007/s00253-003-1447-8

Soliman, N., Aly, S., (2011). Occurrence and identification of yeast species isolated from Egyptian Karish cheese. J*. Yeast Fungal Res*. 2, 59–64.

Spath, K., Heinl, S., Grabherr, R., (2012). "Direct cloning in Lactobacillus plantarum: Electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete." *Microb. Cell Fact.* 11, 1. doi:10.1186/1475-2859-11-141

Stiles, J., Penkar, S., Plockova, M., ChumchalovaÁ, J., Bullerman, L.B., (2002). Antifungal Activity of Sodium Acetate and *Lactobacillus rhamnosus. J. Food Prot.* 65, 1188–1191. doi:10.4315/0362-028x-65.7.1188

Stiles, M., (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345. doi:10.1007/BF00395940

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29. doi:10.1016/S0168-1605(96)01233-0

Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., Danner, H., (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 107, 167–177. doi:10.1111 /j.1365-2672.2009.04192.x

Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., Archer, D.B., (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii. Int. J. Food Microbiol*. 166, 126–134. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025

Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., Schnürer, J., (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4322–7. doi:10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002

Svanström, Å., Boveri, S., Boström, E., Melin, P., (2013). The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. *BMC Res. Notes* 6, 464. doi:10.1186/1756-0500-6-464

Temelli, S., Anar, Ş., Sen, C., Akyuva, P., (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control* 17, 856–861. doi:10.1016/j.foodcont.2005.05.012

Ten Brink, B., Konings, W., (1980). Generation of an electrochemical proton gradient by lactate efflux in membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 11, 59–66.

Ten Brink, B., Otto, R., Hansen, U., Konings, W., (1985). Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 162, 383–390.

Therdtatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., Nitisinprasert, S., (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling. *Springerplus* 5. doi:10.1186/s40064-016-2693-4

Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Berni, E., (2017). Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 116–123. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.023

Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y., (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033

Valerio, F., Di Biase, M., Lattanzio, V.M.T., Lavermicocca, P., (2016). Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol*. 222, 1–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.011

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., Visconti, A., (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: An approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol. Lett*. 233, 289–295. doi:10.1016/j.femsle.2004.02.020

van der Lelie, D., van der Vossen, J.M., Venema, G., (1988). Effect of Plasmid Incompatibility on DNA Transfer to *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 865–86571.

Viana, R., Yebra, M.J., Galán, J.L., Monedero, V., Pérez-Martínez, G., (2005). Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei. Res. Microbiol.* 156, 641–649. doi:10.1016/j.resmic.2005.02.011

Viegas, C., Sa Correia, I., (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol* 137, 645–651.

Viljoen, B.C., Greyling, T., (1995). Yeasts associated with Cheddar and Gouda making*. Int. J. Food Microbiol.* 28, 79–88. doi:10.1016/0168-1605(94)00114-L

Vimont, A., Fernandez, B., Ahmed, G., Fortin, H.P., Fliss, I., (2019). Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt. *Int. J. Food Microbiol*. 289, 182–188. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.005

Visser, J., Schaier, R., Van Gorkom, M., (1979). The role of calcium, phosphate and citrate ions in the stabilization of casein micelles. *J Dairy Res.* 46, 333–335.

Vollenweider, S., Lacroix, C., (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 64, 16–27. doi:10.1007/s00253-003-1497-y

Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., (2010). Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* 21, 136–142. doi:10.1016/j.foodcont.2009.04.007

Wang, H., Mcentire, J.C., Zhang, L., Li, X., Doyle, M.P., (2012). The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,*31, 249–260. doi:10.20506/rst.31.1.2117

Welthagen, J.J., Viljoen, B.C., (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 185–194. doi:10.1016/S0168-1605(98)00042-7

Whitman, W.B., (2009). Bergey's manuel of systematic bacteriology: The Firmicutes, *Springer 3thr edition*. doi:10.1016/ j.ijporl.2011.05.009

Winter, G., Hazan, R., Bakalinsky, A.T., Abeliovich, H., (2008). Caffeine induces macroautophagy and confers a cytocidal effect on food spoilage yeast in combination with benzoic acid. *Autophagy* 4, 28–36. doi:10.4161/auto.5127

Wu, Q., Shah, N.P., (2017). The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods. *Food Microbiol*. 62, 178–187. doi:10.1016/j.fm.2016.10.027

Yang, E., Kim, Y., Chang, H., (2011). Purification and Characterization of Antifungal δ-Dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 Isolated from Kimchi. *J. Food Prot*. 74, 651–657. doi:10.4315/0362-028x.jfp-10-512

Yang, X., Li, J., Shi, G., Zeng, M., Liu, Z., (2019). Improving 3-phenyllactic acid production of *Lactobacillus plantarum* AB-1 by enhancing its quorum-sensing capacity. *J. Food Sci. Technol*. 56, 2605–2610. doi:10.1007/s13197-019-03746-1

Yépez, A., Luz, C., Meca, G., Vignolo, G., Mañes, J., Aznar, R., (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin*. Food Control* 78, 393–400. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.009

Yılmaz, C., Gökmen, V., (2017). Formation of tyramine in yoghurt during fermentation – Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum. Food Res. Int.* 97, 288–295. doi:10.1016/j.foodres.2017.04.014

Yu, H.S., Lee, N.K., Jeon, H.L., Eom, S.J., Yoo, M.Y., Lim, S.D., Paik, H.D., (2016). Benzoic Acid Production with Respect to Starter Culture and Incubation Temperature during Yogurt Fermentation using Response Surface Methodology. Korean *J. Food Sci. Anim. Resour*. 36, 427–434. doi:10.5851/kosfa.2016.36.3.427

Yun, J.E., Lee, D.G., (2016). A novel fungal killing mechanism of propionic acid. *FEMS Yeast Res.* 16, 1–8. doi:10.1093/femsyr/fow089

Zagorec, M., Champomier-verges, M., Christieans, S., (2013). La biopréservation et les micro-organismes bioprotecteurs, Introduction : Flores protectices pour la conservation Des Aliments. Versailles, pp. 1–7.

Zerfiridis, G.K., Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., (2010). Changes During Ripening of Commercial Gruyère Cheese. *J. Dairy Sci.* 67, 1397–1405. doi:10.3168/jds.s0022-0302(84)81454-x

Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., Gänzle, M., (2015). A genomic view of *lactobacilli* and *pediococci* demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7233–7243. doi:10.1128/AEM.02116-15

VIII- Annexes

Annexe 1: Characterization of antifungal compounds produced by lactobacilli in cheese-mimicking matrix: comparison between active and inactive strains

(Soumis à dans « International Journal of Food Microbiology » le 29 juillet 2019).

ROUXEL Meg[ab], BARTHE Manon[a], MARCHAND Pierre[b], JUIN Camille[a], MONDAMERT Leslie[c], BERGES Thierry[d], BLANC Philippe[b], VERDON Julien[a], BERJEAUD Jean-Marc[a], AUCHER Willy[a].

[a]Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie and Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Bât B37, 1 rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers Cedex 9, France

[b]Bioprox, 6 rue Barbès, 92532 Levallois-Perret, France

[c]Université de Poitiers, UMR CNRS 7285 IC2MP, Department of Water and Geochemistry, ENSIP, 1 Rue Marcel Doré, TSA 41105, 86073 Poitiers Cedex, France

[d]Université de Poitiers, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, CNRS ERL 7368, Bât B31, 1 rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers Cedex 9, France

ROUXEL Meg: meg.rouxel@univ-poitiers.fr

BARTHE Manon: manon.barthe@etudiant.univ-rennes1.fr

MARCHAND Pierre : p.marchand@bioprox.com

JUIN Camille : camille.juin@univ-poitiers.fr

MONDAMERT Leslie : leslie.mondamert@univ-poitiers.fr

BERGES Thierry : thierry.berges@univ-poitiers.fr

BLANC Philippe : p.blanc@bioprox.com

VERDON Julien : julien.verdon@univ-poitiers.fr

BERJEAUD Jean-Marc : jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr

*Corresponding author : AUCHER Willy

Laboratoire Ecologie and Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267

Equipe microbiologie de l'eau

1 rue Georges Bonnet

86073 Poitiers Cedex 9, France

Tel : +33 (0)5.49 45 36 38

E-mail : willy.aucher@univ-poitiers.fr

*Co-corresponding author: BERJEAUD Jean-Marc

Laboratoire Ecologie and Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267

Equipe microbiologie de l'eau

1 rue Georges Bonnet

86073 Poitiers Cedex 9, France

Tel : +33 (0)5.49 45 40 06

E-mail : jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Biopreservation of dairy products by acid lactic bacteria appears as a promising alternative to either replace or reduce the use of chemical preservatives. The purpose of this study was to identify bacteria preventing fungal spoilers growth in dairy products and to understand their antifungal activity in this complex matrix. Firstly, antifungal activity of eighteen *Lactobacillus* strains was tested against five molds and four yeasts leading to selection of *L. casei* 7006 which had an activity against seven fungal targets. Then, challenge tests against *C. lusistaniae* 3668 in a cheese-mimicking matrix have been performed demonstrating that this strain was able to reduce strongly this yeast growth after 14 and 21 days storages at 7°C. Finally, different antifungal compounds were searched. Their presence in cheese-mimicking matrix containing *L. casei* 7006 strain was compared to the one prepared with an inactive strain (*L. casei* 6960) or without bioprotective strain. Three compounds were produced differently between cheeses with or without *Lactobacillus* strain after 21 days at 7°C: lactic acid, benzoic acid and diacetyl. However, lactic acid concentrations were similar between the three cheeses after 14 days at 7°C, but an antifungal activity was only associated to *L. casei* 7006 presence. Benzoic acid concentrations between cheese with *L. casei* 7006 and negative control *L. casei* 6960 were also the same. Production of diacetyl in cheese with *L. casei* 7006 seems related to its antifungal activity.

Keywords: biopreservation, *Lactobacillus*, yeast, organic acids, fatty acids, volatiles

1. Introduction

Throughout their processing and storage, food raw materials are likely to be colonized by spoilage micro-organisms. It is estimated that 5 to 10% of global food production is lost due to the proliferation of yeasts and/or molds within these matrices **(Pitt and Hocking, 2009)**. The dairy industry is the second largest food industry in the world and is highly concerned. To solve this problem and meet the growing consumer demand to get rid of chemical preservatives in food products, biopreservation with bacterial ferments emerge as the best alternative **(Stiles, 1996)**.

Currently, chemical preservatives are listed and authorized by in the European Union (EU) and Food and Drug Administration (FDA): sorbic acid, potassium sorbate and calcium sorbate can be added to some dairy products such as margarine or cheese and natamycin in cheese **(EFSA, 2015, 2009; FDA, 2019)**. Beyond these chemical treatments and physical ones, such as pasteurization or cold storage, the oldest method for preserving food, potentially used more than 3000 years ago, was fermentation by lactic acid bacteria (LAB). Many studies have described the use of LAB against molds and yeasts, especially *Lactobacillus* strains in dairy product **(Crowley *et al.*, 2012; Delavenne *et al.*, 2015; Lačanin *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2013; Mcnair *et al.*, 2018; Ouiddir *et al.*, 2019; Salas *et al.*, 2018)**. Moreover, the majority of them is generally recognized as safe (GRAS) by the US Food and Drug Administration, and some of them have been also granted a QPS (Qualified Presumption of Safety) status within the European Union **(EFSA, 2012),** making their use as food additives easier**.**

Many *Lactobacillus* strains were described to produce antifungal molecules, including: short organic acids (lactic acid or acetic acid) **(Corsetti *et al.*, 1998)**, acids derived from amino acid metabolism (phenyllactic acid, benzoic acid) **(Broberg *et al.*, 2007; Brosnan *et al.*, 2012; Lavermicocca *et al.*, 2000)**, fatty acids **(Bergsson *et al.,* 2001; Black *et al.,* 2013b; Ndagano *et al.,* 2011) ,** proteinaceous compounds **(Magnusson and Schnürer, 2001)**, cyclic dipeptides **(Ström *et al.,* 2002)** or volatile compounds **(Aunsbjerg *et al.*, 2015)**, etc. It has to be noticed that the majority of these molecules have been first identified from cultures in liquid MRS medium (**Brosnan *et al.*, 2012**), which is quite different from dairy products. Antifungal

compounds, such as organic acids, derived from metabolism and can vary a lot, in term of concentration, depending on medium composition. Milk is a complex food medium which contains lactose, organic and inorganic salts, vitamins, proteins (majority of caseins) and lipids. During its fermentation by LAB, pH decreases leading to protein coagulation, making the analysis of this matrix more complicated. During last years, some studies have investigated antifungal compounds produced in milk, sour cream, or yoghurt **(Luz *et al.*, 2018; Mcnair *et al.*, 2018; Mosbah *et al.*, 2018; Ouiddir *et al.*, 2019)** but the role of each compound in antifungal activity is still unclear.

In this study, several *Lactobacillus* isolates were investigated for their antifungal potential against dairy industry contaminants. First, eighteen strains were screening against five molds and four yeasts. Antifungal activity of an association between starter culture and the four selected *Lactobacillus* was investigated in cheese-mimicking matrix (CMM). *L. casei* 7006, the most active isolate, displayed a good activity against *C. lusitaniae* 3668. Finally, antifungal compounds produced in CMM by *L. casei* 7006, as well as the negative control *L. casei* 6960, were compared to understand antifungal activity of *L. casei* 7006.

2. Materials and methods

2.1 Strains and culture conditions

Eighteen *Lactobacillus* strains from BIOPROX collection have been previously isolated from dairy products (table 1). They were routinely propagated on de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD™ Difco™, France) agar (1,5%) at 30°C. Counting of bioprotective strains in cheese-mimicking matrix (CMM) was done on MRS medium (BD™ Difco™, France) acidified to pH 5.4 using acetic acid.

Nine fungal contaminants were previously isolated from dairy products by BIOPROX, 5 filamentous molds and 4 yeasts: *Mucor sp.* 3652, *Penicillium crustosum* 3673, *Penicillium chrysogenum* 3674, *Penicillium roqueforti* 3675, *Aspergillus niger* 4624, *Saccharomyces boulardii* 3667, *Candida lustianiae* 3668, *Candida intermedia* 3669, *Rhodoturula mucilaginosa* 3671. Filamentous fungi were cultivated on potato dextrose agar (PDA) for 2 weeks at 25°C. Spores were harvested by submersion

with a sodium chloride (9 g/L) tween 80 (0.01%) solution. For antifungal activity assay, yeasts were cultivated on Yeast Nitrogen Base (YNB) broth containing glucose (5 g/L) for 18h at 25°C.

2.2 Antifungal activity assay

2.2.1 In vitro screening

The antifungal activity was evaluated by an agar spot test and an agar overlay method.. Agar spot test was used for filamentous molds. Briefly, overnight cultures of lactobacilli (5 µL) were inoculated in milk agar (10% w/v skim milk and 15 g/L agar) (25 mL) and grown for 24h at 30°C. Fungal spores were enumerated under a microscope using a Fast-Read 102® (BIOSIGMA, Italy) and adjusted to 2 log_{10}spores/mL. Five microliters of each spore suspension were spotted on the surface of the plate and incubated for 7 days at 25°C. The mycelium growth was measured and compared to that in milk media without lactobacilli.

The agar overlay method described by Magnusson and Schnürer (2001) was used against yeasts with some modifications. Each *Lactobacillus* strain was striated on MRS agar plate and incubated for 24h at 37°C. Yeasts were enumerated under a microscope using a Fast-Read 102®. Plates were overlaid with 7 mL of Yeast extract-Peptone-Dextrose soft agar (YPD) (yeast extract 10 g/L; peptone 20 g/L; glucose 20 g/L) containing 6 log_{10}cells/mL of *S. boulardii* 3667 or *R. mucilaginosa* 3671 or 7 mL of Yeast-Malt-Dextrose soft agar (YM)(yeast extract 3g/L; malt extract 3g/L; tryptone 5g/L; glucose 10g/L) containing 6 log_{10}cells/mL of *C. lustianiae* 3668 or *C. intermedia* 3669. The plates were incubated for 48h at 25°C (except for *S. boulardii* 3667 at 30°C).

2.3 Challenge test in cheese-mimicking matrix

2.3.1 Preparation of lyophilized Lactobacillus

Ferment production was realized for six strains of *Lactobacillus*. Each strain was cultured 16h at 37°C in Industrial Fermentation Medium (IFM) (glucose 20 g/L, liquid yeast extract 50 g/L, sorbitol monooleate 1 g/L, $MgSO_4$ 1 g/L, $MnSO_4$ 0.5 g/L), supplemented with K_2HPO_4 (2 g/L) and sodium acetate (5 g/L) for the pre-culture.

Lactobacillus were then inoculated (1% v/v) in 1L of IFM in a fermenter (17h at 35°C, 300 rpm agitation). During the whole process, pH was set to 5.7 by the addition of NH_4OH. All ferments were freeze-dried.

2.3.2 Challenge test

CMM was produced from 1 L of pasteurized (84°C for 40 min) 10% (w/v) skim milk inoculated with 3 U/100L of a commercial starter culture (DI-PROX M 270, BIOPROX, France). Milk was distributed in 100 mL bottles with or without the addition of bioprotective strains at 1.6 log_{10}CFU/mL. Fermentation of milk was achieved at 22°C for 18h in a water bath and was then contaminated with *C. lustianiae* 3668 at 1.7 log_{10}CFU/mL. Five milliliters per well were dispatched into 6-well plates and stored for 21 days at 7°C. Growth and stability of bioprotective strains were analyzed by CFU count within acidified MRS agar. The number of viable *C. lusitaniae* 3668 cells was determined by enumerating CFU on Sabouraud glucose agar with chloramphenicol (150 µg/mL) (Sigma-aldrich, USA) after 24h at 25°C. Antifungal activity of bioprotective strains was determined by comparing *C. lusitaniae* 3668 CFU counts in the presence or absence of the bioprotective strains after 14 and 21 days. ”Whey” from CMM were prepared by centrifugation at 10,000 g for 30 minutes and supernatant (whey) filtering on 0.2 µm.

2.4 Analytical methods

2.4.1 Quantification of lactic and acetic acid

Concentrations of both lactic and acetic acids in whey were determined using a Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific™ Dionex™, USA). Whey was diluted in H_2O ($1/10^{th}$) and 100 µL were injected on an Aminex column HPX-87 (300 mm x 7.8 mm) (BioRad, USA) maintained at 30°C. Sulfuric acid (3 mM) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min in isocratic mode with a running time of 30 min. Organic acids were detected with a Ultimate 3000 Diode Auray Dector (Thermo Scientific™ Dionex™, USA) at 210 nm.

2.4.2 Extraction, identification and quantification of antifungal compounds by QuEChERS

The CMM were treated using QuEChERS methodology for the extraction of antifungal compounds as described by Brosnan *et al.* (2014) with some modifications. 15 mL of CMM were added to 15 mL of acetonitrile (ACN) with 0.1% of formic acid (FA), 6 g of $MgSO_4$ and 1.5 g of NaCl and shaked for 1 min. The mixture was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. Thirteen milliliters of the organic phase were transferred to a 15 mL QuEChERS Dispersive SPE tube (Agilent, USA). The tubes were centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. Ten milliliters of solvent were dried under R-124 Rotary Vap System (Buchi, Switzerland) at 42°C, 1 mL of H_2O was added to resuspend each extract which was then diluted ($1/50^{th}$ and $1/20^{th}$). 4 µL of each were injected onto LC-MS system. To determine extraction yield, the same procedure was applied to CMM supplemented with 10 µg/mL of each searched molecule: DL-p-hydroxyphenyllactic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyhydrocinnamique acid, vanillic acid, caffeic acid, (S)-2-hydroxyisocaproic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, p-coumaric acid, phenyllactic acid, ferulic acid, benzoic acid, salicylic acid, hydrocinnamic acid and methylcinnamic acid.

Separation of antifungal compounds was achieved using a LC system equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 Column (1.7 µm, 4.6 mm X 100 mm) (Waters, USA). An H_2O (A)/ ACN (B)/ FA 0.2 % (v/v) solvent system was used at a flow rate of 0.5 mL/min with the following conditions : 0 min – 5% (B) ; 2 min –10% (B) ; 6 min – 25% (B) ; 8 min – 30% (B) ; 10 min – 45 % (B) ; 12 min – 95% (B) ; 13 min – 95% (B) ; 15 min – 5% (B). The molecular masses of eluted molecules were determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) with a Xevo Q-TOF (Waters, USA) mass spectrometer in negative mode. The spray voltage was set to 3.5 kV, the source temperature to 120 °C, and the desolvation temperature to 450 °C.

2.4.3 Tests for antifungal peptides detection within CMM

After storage for 21 days, 16 g ammonium sulfate have been added to 30 mL of filtered whey, the mix being gently agitated for 18h at 4°C. After centrifugation for 45 min at 4°C, the pellet was dissolved in 1.5 ml H_2O. Activity of this sample has been tested using microtiter plate assay. In a 96-wells plate, 100µL were mixed with 100µL

of suspension of *C. intermedia* 3669 (the most sensitive target) containing 5 log_{10}cells/mL. Plates were incubated for 24h at 25°C at 180 rpm. The number of viable *C. intermedia 3669* was determined by colony-forming unit counting onto Sabouraud glucose agar with Chloramphenicol 150 µg/mL (Sigma-aldrich, USA) after 24h at 25°C.

2.4.4 Fatty acids analysis

Fatty acid extractions were carried out from whey after 14 and 21 days of storage at 7°C. In order to compare the samples with each other and to avoid variability due to extraction efficiency, an internal standard (500 µL heptadecanoic acid at 1 mg/mL) was added to 30 mL of whey before starting. Subsequently, the extraction was carried out as described by Ndagano *et al.* (2011) with some modifications. 60 mL chloroform/methanol (2:1, v/v) was added to 30 mL of each whey. The mixture was homogenized for 1 min and then let settle for 30 min. The organic phase was recovered, and the aqueous phase was extracted again twice.

The organic phases collected were evaporated at 42°C, and all traces of water were removed by adding $MgSO_4$. The dry extracts were methylated by adding 2 mL of methanol/sulfuric acid (2.5%, v/v) followed by a 16-hours incubation at 55°C. Subsequently, 1.5 mL water and 1.5 mL hexane were added to the samples, then vortexed for 1 min and centrifuged at 410 g for 30 s. The organic phase was collected, and the aqueous phase was again extracted with 1.5 mL of hexane. The organic phases were pooled and evaporated under nitrogen at 80°C, the dry extracts were taken up in 500 µL of hexane. These samples were then analyzed in GC on a HP-5 column (30 m x 320 µm x 0.25 µm, Agilent, France) at a rate of 4 mL/min in helium. In order to identify fatty acids, methylated standard solutions of 4 to 24 carbons long fatty acids, saturated or unsaturated, were analyzed in the same way as well as 3-hydroxydecanoic acid. (#18919-1AMP, #49453-U, #H3648, Sigma-Aldrich). The program used was as follows: 50°C 1 min, 50 to 200°C in 3 min (50°C/min), 200 to 240°C in 8 min (5°C/min), 240 to 290°C in 1 min (50°C/min). The molecules were detected by a flame ionization detector (FID) at 300°C.

2.4.5 Analysis of volatile compounds

After 18h fermentation at 22°C, 10 mL of CMM were deposited into 20 mL vials, hermetically sealed and stored at 7°C for 21 days. The vials were then preheated to 50°C for 30 minutes. The extraction of the molecules from the head space was carried out using a Carboxen™/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber (57325-U, Supelco) for 1 hour at 50°C.

The separation and analysis of volatile compounds was performed using GC-MS (GC 7890 A, MS 5975 C, Agilent). The molecules were desorbed from the fiber directly into the GC injector, which is pre-heated at 250°C for 5 minutes. Separation was carried out using a capillary column (122-7032, DB-WAX, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, Agilent). Helium was the carrier gas used at a rate of 1 mL/min. The temperature gradient consisted of a tray at 40°C for 5 minutes then an increase to 140°C, at 7°C per minute, and then 13°C per minute until 250°C. MS detection parameters were: positive electronic ionization, 70 eV, full-scan mode, mass (m)/charge (z) = 35-400 amu (atomic mass unit), interface temperature of 300 °C.

Diacetyl concentration was determined using a calibration curve obtained after extraction of whey supplemented with it, concentrations ranging from 1 to 30 µg/mL.

2.5 Statistical Analysis

Each experiment was conducted thrice. Statistical comparisons were performed by Student's test ($p < 0.05$ was considered as statistically significant). All graphs and statistical studies were performed using Graph pad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc.).

3. Results

3.1. Antifungal activity screening

3.1.1 Anti-mold activity

The antifungal activity of 18 lactobacilli strains was tested by spotting 5 molds, *A. niger* 4624, *Mucor* sp. 3652, *P. crustosum* 3673, *P. chrysogenum* 3674 and *P. roqueforti* 3675, on 24h cultures grown in milk agar. Results are presented on Table 1 and an example is depicted on Figure 1. Three levels of activity were then observed: a total inhibition of mycelial growth (noted ++ and Figure 1A), weak growth of fungus with no mycelial expansion (noted +) and large mycelial development (noted – and Figure 1B). None of the eighteen *Lactobacillus* strains was found to be active against *Mucor sp*. 3652. Eleven strains inhibited completely the growth of *A. niger* 4624 and nine of these strains displayed also a high activity against *P. chrysogenum* 3674. Thirteen strains inhibited the development of mycelium in *P. crustosum* 3673, from which five were also active against *P. roqueforti* 3675. Finally, five strains, *L. rhamnosus* 5326, *L. rhamnosus* 6311, *L. casei* 7006, *Lactobacillus* sp. 5661 and *Lactobacillus* sp. 6795 displayed the broadest spectrum of activity since they inhibit four molds out of five.

3.1.2 Anti-yeast activity

The activity of the 18 bacterial strains was also tested against dairy products contaminating yeasts as described by Magnusson and Schnürer (2001) with some modifications. Briefly, each tested *Lactobacillus* strains has been streaked on MRS and grown 24h at 37°C. The plates were then overlaid with YM soft agar containing target yeasts (*S. boulardii* 3667, *C. lusitaniae* 3668, *C. intermedia* 3669 or *R. mucilaginosa* 3671) and incubated for 48 hours at 25°C. Activity was correlated to the inhibition of yeast growth around *Lactobacillus* streak (Figure 2 and Table 2). Three profiles were observed: inhibition halo greater than 0.5 cm (++ and Figure 2A), inhibition halo less than 0.5 cm (+), no visible inhibition (- and Figure 2B). None of the 18 strains of Lactobacillus was found to be active against *S. boulardii* 3667. Nine strains had strong activity (++) against *C. intermedia* 3669 and six against *R. mucilaginosa* 3671. The seven strains which inhibited weakly (+) *C. lusitaniae* 3668

showed a higher activity against *C. intermedia* 3669. Only six strains were found to be active against the three sensitive yeasts, among them *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 and *L. zymae* 6188 displayed the highest activities.

3.1.3 Selected strains

The two screening tests revealed two strains with a broad spectrum of antifungal activity against both the molds and yeasts tested: *L. rhamnosus* 5326 and *L. casei* 7006, which were chosen for subsequent analyses. In order to detect potential anti-yeast specific compounds, *L. spicheri* 6187 and *L. zymae* 6188, which were found inactive against molds, were also selected according to their anti-yeast activity, similar to *L. rhamnosus* 5326 and *L. casei* 7006. Finally, the inactive strains *L. paracasei* 6363 and *L. casei* 6960 were chosen as negative controls.

3.2 Challenge Test

The ultimate goal of this selection was to incorporate a protective strain in an industrial cheese, made using other dedicated starters. As a consequence, we decided to analyze the antifungal activity using challenge test methodology, by producing CMM, in order to be closer to dairy products.

Accordingly, the six selected strains were inoculated in milk in association with cheese starter cultures (two strains: *Lactococcus lactis subsp cremoris* and *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*) and grown for 18 hours at 22°C. Starter cultures allowed rapid acidification in a way close to their industrial application. After fermentation, cheeses were contaminated by *C. lustianiae* 3668 (1.2 $\log_{10}$CFU/mL) to simulate a post processing contamination. *C. lustianiae* 3668 was enumerated at 14 and 21 days after inoculation.

3.2.1 Antifungal activity of biopreservative cultures

In a preliminary experiment, growth of the lactobacilli was monitored (Table 3). Growth rates were all found similar at about 1 $\log_{10}$CFU/mL after 18h at 22°C (Student Test, p-values > 0.05). During storage at 7°C without biopreservation ferment, the concentration of *C. lusitaniae* 3668 reached 5.2 $\log_{10}$CFU/mL after 14 days and 7.3 $\log_{10}$CFU/mL after 21 days. Strains *L. paracasei* 6363, *L. casei* 6960, *L.*

spicheri 6187 and *L. zymae* 6188 did not significantly inhibit *C. lusitaniae* (Figure 3). A growth inhibition of 0.7 log10CFU/mL after 14 days compared to the control was observed when *L. rhamnosus* 5326 was added to a cheese. A higher inhibition of 1.4 log_{10}CFU/mL after 21 days was observed with the same strain. The addition of *L. casei* 7006 induced a yeast growth inhibition of 2.2 log_{10}CFU/mL after 14 days and reached 3.6 log_{10}CFU/mL after 21 days. After storage for 14 and 21 days, the pH of CMM was not significantly different when prepared with or without biopreservation ferment (Student Test, p-values >0.05) (Table 4). In order to identify compounds implicated in antifungal activity, subsequent analysis were conducted considering only active *L. casei* 7006 and inactive *L. casei* 6960 used as biopreservatives in challenge tests.

3.2.2 Production of lactic and acetic acid

After 14 days storage at 7°C, the concentrations of lactic acid in all cheeses were close and ranged from 10.3 to 11.5 g/L (Table 4). Thus, the difference in lactic acid level in CMM obtained with or without *L. casei* 7006 was not significant (Student tests, p-values > 0.05) and, therefore, did not explain the inhibitory activity observed. After 21 days, the concentration of lactic acid was found similar between cheese with negative control and without *Lactobacillus* (9.8 and 10.5 g/L). CMM made with *L. casei* 7006 presented a significantly higher concentration at 13.7 g/L (Student Test, p-value <0.05) (Table 4). HPLC analysis did not reveal the presence of acetic acid in any CMM.

3.2.3 Quantification of other organic acids by QuEChERS coupled to LC-MS

CMMs containing *L. casei* 7006, *L. casei* 6960 or no *Lactobacillus* were extracted using a QuEChERS method. Samples were then analysed using LC-MS, searching for fifteen known antifungal compounds. Among them, four organic acids were detected: phenyllactic acid (PLA), DL-p-hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA), (S)-2-hydroxyisocaproic acid (HICA) and benzoic acid (BA) (Table 4). High quantities of HICA were detected in all samples. It has to be noticed that this acid was also found in the control CMM without biopreservation ferment, at a concentration of 45.2 µg/mL after 14 days and 39.5 µg/mL after 21 days of storage. The quantity of HICA detected

in CMM, prepared with biopreservation strain, after 14 days (54.24 µg/mL) was not significantly different from the control (Student test, p-values > 0.05) (Table 4).

After 21 days of storage, CMM inoculated with *L. casei* 7006 contained significantly different amounts of HICA compared to CMM with no *Lactobacillus* (57.7 vs 39.2 µg/mL) (Student Test, p-values < 0.05). However, there weren't differences between cheese containing *L. casei* 7006 and negative control *L. casei* 6960, so activity was not correlated to presence of this acid (Table 4).

PLA was detected in each CMM. In the absence of biopreservation ferment, its level of 10.6 µg/mL was stable over time. After 14 days of storage, the concentration of PLA was not significantly different between CMM prepared or not with *L. casei* 7006 and *L. casei* 6960 (Student Tests, p-values >0.05). After 21 days of storage, PLA concentration remained stable for cheeses containing *L. casei* 7006. However, CMM with *L. casei* 6960 had a significant increase in PLA level (from 11.4 to 15.6 µg/mL) (Student tests, p-values >0.05), which did not induce an increase in activity. As a consequence, PLA was probably not responsible for the activity found with *L. casei* 7006 (Table 4).

In the control, OH-PLA was detected at a concentration of 1.1 µg/mL after 14 days, reaching 1.5 µg/mL after 21 days. The production of this acid in CMM made with *L. casei* 7006 after 14 days was significantly different from the control (Student test, p-values > 0.05). Its concentration was higher in CMM containing *L. casei* 6960 (3.8 µg/ml). After 21 days of storage, OH-PLA production in CMM prepared with *L. casei* 7006 and *L. casei* 6960 was significantly different from control, with 4.0 and 6.1 µg/mL respectively against 1.5 without lactobacilli. These results showed that this acid was not, or not only, responsible for the activity within *L. casei* 7006 containing cheese (Table 4).

Unlike the others, benzoic acid was not detected in control CMM. This result demonstrated that it was not or very weakly produced by acidification strains. After 14 days of storage, the amount of benzoic acid was not significantly different between CMM with *L. casei* 7006 and negative control *L. casei* 6960 (12.2 and 11.4 µg/mL). Similarly, its quantity was found unchanged after 21 days: 13.6 and 13.1 µg/mL

(Student test, p-values > 0.05). As for other acids, benzoic acid was not, or not only, responsible for the observed differences in activity (Table 4).

3.2.4 Analysis of fatty acids

Fatty acids produced in CMM prepared with strains *L. casei* 7006 and *L. casei* 6960 strains, as well as without biopreservative ferment, were analyzed by GC after extraction and chemical modification as methyl esters **(Ndagano *et al.,* 2011)**. The different fatty acids found are listed in table 5.

The fatty acids composition was identical in the three different CMM. The relative abundance of each fatty acid compared to the internal standard (each CMM was supplemented with heptadecanoic acid) was the same in the different samples (data not shown).

3.2.5 Analysis of volatile compounds

The volatile molecules produced in CMM containing the strains *L. casei* 7006, *L. casei* 6960 and the control without ferment were analyzed by SPME-GC-MS after 21 days storage at 7°C. The profiles obtained are presented in Figure 4. Four compounds were found to have a different abundance between the three CMM, and particularly the one corresponding to peak (1). Comparing with standards, the corresponding molecules were identified as: diacetyl (1), acetoin (2), acetic acid (3) and 2,3-butanediol (4). In CMM with *L. casei* 7006, the relative abondance of diacetyl was higher than control without ferment. In CMM prepared with inactive strain, the presence of diacetyl was not detected and the acetoin relative abundance appeared lower as compared to CMM without *Lactobacillus* strains. Interestingly, the inactive strain *L. casei* 6960, was found to produce the higher amount of 2,3 butanediol). The relative abundance of acetic acid is lower (around 57%) in CMM containing *L. casei* 7006 strain than in CMM containing *L. casei* 6960 confirming that this acid was not responsible for the activity.

The diacetyl concentration present after 21 days of storage was estimated at 1.8 µg/mL in CMM without biopreservation ferment. In CMM containing the

biopreservation ferment *L. casei* 7006, the diacetyl concentration is estimated at 16 µg/mL, about 10 times higher than in CMM without *Lactobacillus*.

4. Discussion

Several studies have demonstrated previously the protective effect of *Lactobacillus* bacteria in dairy food matrices such as *L. rhamnosus, L. harbinensis, L. paracasei, L. plantarum* against various fungal contaminants such as *Yarrowia lipolytica, Debaryomyces hansenii, Penicillium commune, Mucor racemous, Galactomyces geotrichum* or *Candida parapsilosis* **(Delavenne *et al.*, 2015; Garnier *et al.*, 2019; Lačanin *et al.*, 2017; Mcnair *et al.*, 2018; Salas *et al.*, 2018)**.

In this study, the antifungal activity of eighteen strains of *Lactobacillus*, isolated from dairy products, was tested. Four strains were selected for their anti-yeast activities against *C. lusitaniae* 3668: *L. rhamnosus* 5326, *L. casei* 7006, *L. spicheri* 6187 and *L. zymae* 6188. Two of these strains *L. rhamnosus* 5326 and *L. casei* 7006 were also found to be active in milk agar against fungi (*P. chrysogenum* 3674 and *P. roqueforti* 3675).

Antifungal activity of the six selected strains was studied using challenge tests (in CMM) in order to evaluate their potential for industrial use, as well as to identify antifungal compounds. Thus, CMM were made using acidification ferments with or without the addition of each *Lactobacillus* strain. Antifungal activity was determined by comparing the growth of the most resistant target among the sensitive yeast tested, *C. lusitaniae* 3668, in the presence or absence of a bioprotective ferment after 14 and 21 days. Only two of the six strains tested were able to reduce the growth of the target yeast: *L. rhamnosus* 5326 and *L. casei* 7006. However, strain *L. rhamnosus* 5326 was less effective after 21 days with a growth inhibition of 1.3 $\log_{10}$CFU/mL compared to 3.6 $\log_{10}$CFU/mL for *L. casei* 7006. Other strains were described to have antifungal properties in dairy matrix, particularly in yoghurt **(Crowley *et al.*, 2012; Delavenne *et al.*, 2015; Lačanin *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2013)**. Thus, *L. harbinensis* K.V9.3.3.1Np, inoculated at 5.10^6 CFU/mL, inhibited *Y. lipolytica* growth **(Delavenne *et al.*, 2015)**. It has been shown that several active compounds such as benzoic acid, a polylactate mixture and a spermidin analogue polyamine, were present in these matrices **(Mosbah *et al.*, 2018)**. The strains *L. paracasei*

SYR90, *L. plantarum* OVI and *L. rhamnosus* BIOIII28 also displayed antifungal activity against *R. muciliginosa* and *P. brevicompactum* in yoghurt, however the molecules responsible for these properties were not identified **(Lačanin *et al.*, 2017)**.

To investigate the molecules responsible for inhibition, the major organic acids produced in the CMM were analyzed by HPLC. The lactic acid level and the pH after 14 days were similar between protected and unprotected CMM (~ 10 g/L), which demonstrated that lactic acid is not responsible for activity by itself. However, after 21 days, CMM with *L. casei* 7006 strain showed an increase of lactic acid, reaching 13.7 g/L.

In 2012 and 2014, Brosnan and collaborators developed a rapid extraction method (QuEChERS), dedicated to the detection and quantification of 25 antifungal compounds by LC-MS, to analyze mixtures whose activity was due to complex synergies. In our study, four of these antifungal compounds, were found to be produced: OH-PLA, PLA, BA, and HICA. However, no link between these four acids and activity could be established since their production was found similar between the active ferment *L. casei* 7006 and the negative control *L. casei* 6960. The detected amount is even higher for PLA and OH-PLA in the CMM containing *L. casei* 6960. Although BA was only found in CMM containing *Lactobacillus*, no correlation was found between detected amounts and observed antifungal activity.

Some studies investigated antifungal molecules by comparing matrices inoculated or not with potential biopreservative strain **(Mcnair *et al.*, 2018; Ouiddir *et al.*, 2019)**. In our study, we decided to add another condition, a strain with no activity against the fungal target in challenge test, here strain *L. casei* 6960. Indeed, this strain also produced potential antifungal compounds: the comparison of these with the ones produced by the active strain *L. casei* 7006 has shown that their concentrations were frequently the same. This strengthens the idea that the activity is linked to synergies of molecules, including acids, produced in dairy matrices.

Other antifungal compounds have been described to inhibit the growth of fungi in dairy products. Thus, the aqueous portion of fresh cream sample inoculated with *L. rhamnosus* CH126 and *L. paracasei* strains at 5.10^6 CFU/mL showed a 50% inhibition of *Debaryomyces hansenii* **(Mcnair *et al.*, 2018)**. This inhibition was

correlated with the presence of a peptide derived from casein digestion: DMPIQAFLLY. As a consequence, the search for active peptides derived from milk protein was carried out CMM inoculated with strains *L. rhamnosus* 5326 and *L. casei* 7006 but remained unsuccessful (data not shown).

Antifungal activity of fatty acids was also described in several studies **(Black *et al.,* 2013a; Ndagano *et al.,* 2011; Sjogren *et al.,* 2003).** Total fatty acids were extracted from CMM containing *L. casei* 7006, *L. case*i 6960 or no bioprotective cultures. The fatty acid abundances in these three CMM were not different, indicating that these molecules are not responsible for the antifungal activity observed with *L. casei* 7006.

It was previously demonstrated that the interaction between acidification and biopreservation ferments is important for antimicrobial activity within milk matrices **(Delavenne *et al.*, 2015; Lačanin *et al.*, 2017)**. In this way, the association between acidification ferments and the *L. paracasei* DGCC 2132 strain resulted in an increase of a volatile antifungal molecule production during yogurt fermentation: diacetyl **(Aunsbjerg *et al.*, 2015)**. The presence of this molecule has been correlated with the growth inhibition of *Penicillium solitum* DCS 302 and *Penicillium* sp. nov. DSC 1541. Storage of yoghurts with the ferment *L. paracasei* DGCC 2132 increased diacetyl amount more than four times. In the present study, analysis of volatiles compounds has shown an increase of about ten times of diacetyl in CMM made with *L. casei* 7006 (16 µg/mL) compared to a cheese without bioprotective cultures (1,8 µg/mL) or negative control *L. casei* 6960 (not detected). This result on yeast contaminant is in good agreement with results obtained by Aunsbjerg and collaborators (2015) on molds. Thus, looking for variants whose diacetyl conversion to 2,3-butanediol is less efficient could be a way to improve antifungal activity of lactobacilli as suggested by the comparison of the active and inactive strains, the last one showing no diacetyl whether it produced the highest level of 2,3-butanediol.

The association of several biopreservative ferments in order to increase activity was also described and presents a promising research axis **(Salas *et al.*, 2018)**: in fresh cream and cheddar cheese, associations of *L. plantarum* L244 to *L. harbinensis* L172 or *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 has shown a higher antimicrobial activity than those of the three strains alone. Other studies have shown a better activity for coculture of

L. paracasei and *Propionibacterium jensenii* in yoghurts as compared to mono-cultures **(Schwenninger and Meile, 2004)**. However, the antifungal molecules have not yet been identified. Thus, a study of different *Lactobacillus* associations (Table 1 and 2) could be considered in order to increase their anti-fungal activity within CMM and to identify the implicated molecules. Indeed, recent works dealing with biopreservation of shrimp have shown that the quorum-sensing communication mediated by LuxS/AI-2 between *Lactobacillus plantarum* AB-1 and *Lactobacillus casei* improved their antimicrobial activity **(Li *et al.,* 2019)**. Moreover, the same authors have shown that *Lactobacillus plantarum* AB-1 PLA production was increased in presence of exogenous 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, the AI-2 precursor **(Yang *et al.,* 2019)**. As the lowering of pH is known to strongly induce a LuxS homologue in *Lactococcus lactis* **(Frees *et al.,* 2003)**, studying crosstalk between *Lactococcus lactis* ferments and *L. casei* 7006 could be of interest to improve antifungal compounds synthesis.

5. Conclusion

L. casei 7006 strains was a good candidate for use as bioprotective cultures in dairy product. This strain was able to inhibit a broad range of fungi such as *P. crustosum* 3673, *P. chrysogenum* 3674, *P. roqueforti* 3675, *A. niger* 4624, *R. mucilaginosa* 3671, *C. intermedia* 3669 and *C. lustianiae* 3668. After a 21 days storage at 7°C, association between *L. casei* 7006 and starter cultures in cheese-mimicking matrices increased production of three antifungal compounds: lactic acid, benzoic acid and diacetyl. Further experiments will be conducted to optimize *L. casei* 7006 use in dairy products, to test its association with other strains, such as *L. rhamnosus* 5326, and to deal with the effects of this strain adjunction on sensory characteristics of the final product.

Acknowledgements

This work was financed by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), BIOPROX, CPER-FEDER 2015-2020 (Contrat de Plan État-Région – Fonds Européen de Développement Régional), CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and University of Poitiers.

6. References

Aunsbjerg, S.D., Honoré, A.H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F.K., Benfeldt, C., Skov, T., Knøchel, S., 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. Int. J. Food Microbiol. 194, 46–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007

Bergsson, G., Arnfinnsson, A., Steingrimsson, O., Thormar, H., 2001. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 3209–3212. doi:10.1128/AAC.45.11.3209-3212.2001

Black, B.A., Sun, C., Zhao, Y.Y., Gänzle, M.G., Curtis, J.M., 2013a. Antifungal lipids produced by *lactobacilli* and their structural identification by normal phase LC/atmospheric pressure photoionization-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 61, 5338–5346. doi:10.1021/jf400932g

Black, B.A., Zannini, E., Curtis, J.M., Gänzle, M.G., 2013b. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1866–1873. doi:10.1128/AEM.03784-12

Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K., Schnürer, J., 2007. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5547–5552. doi:10.1128/AEM.02939-06

Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E.K., Furey, A., 2012. Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. Anal. Bioanal. Chem. 403, 2983–2995. doi:10.1007/s00216-012-5955-1

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. doi:10.1007/s002530051285

Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., 2012. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. J. Appl. Microbiol. 113, 1417–1427. doi:10.1111/jam.12012

Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J., Le Blay, G., 2015. Characterization of the antifungal activity of Lactobacillus harbinensis K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. Food Microbiol. 45, 10–17. doi:10.1016/j.fm.2014.04.017

EFSA, European Food Safety Autority 2015. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. EFSA J. 13, 4144. doi:10.2903/j.efsa.2015.4144

EFSA, European Food Safety Autority 2009. Scientific Opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive 1, EFSA Journal. doi:10.2903/j.efsa.2009.1412.

EFSA, European Food Safety Autority, 2012. Panel on biological hazards (BIOHAZ); 597 Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. EFSA J. 10, 1–84. doi:10.2903/j.efsa.2012.3020

FDA, Food and drug administration Generally Recognized As Safe (GRAS) 2019. https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-food-feeds/generally-recognized-safe-gras-notification-program

Frees, D., Vogensen, F.K., Ingmer, H., 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol. 87, 293–300. doi:10.1016/S0168-1605(03)00104-1

Garnier, L., Mounier, J., Lê, S., Pawtowski, A., Pinon, N., Camier, B., Chatel, M., Garric, G., Thierry, A., Coton, E., Valence, F., 2019. Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. Food Microbiol. 81, 97–107. doi:10.1016/j.fm.2018.11.003

Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J., Karpíšková, R., 2017. Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 0. doi:10.1007/s11274-017-2354-y

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4084–4090. doi:10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000

Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., Lv, J., 2013. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. Food Control 34, 675–680. doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.023

Li, J., Yang, X., Shi, G., Chang, J., Liu, Z., Zeng, M., 2019. Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp. Food Res. Int. 120, 679–687. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.025

Luz, C., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Ritieni, A., Mañes, J., Meca, G., 2018. Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey fermented by different strains of *Lactobacillus plantarum*. Food Funct. 9, 3688–3697. doi:10.1039/c8fo00535d

Magnusson, J., Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1–5. doi:10.1128/AEM.67.1.1-5.2001

Mcnair, L.F., Vinther, J.M., Hansen, A.M., Neves, A.R., Jäger, A.K., Franzyk, H., Stærk, D., 2018. Identification and characterisation of a novel antifungal peptide in fermented milk product containing first-generation bioprotective LAB cultures. FEMS Yeast Res. 18, 1–25. doi:10.1093/femsyr/foy094/5078347

Mosbah, A., Delavenne, E., Souissi, Y., Mahjoubi, M., Jéhan, P., Le Yondre, N., Cherif, A., Bondon, A., Mounier, J., Baudy-Floc'h, M., Le Blay, G., 2018. Novel antifungal compounds, spermine-like and short cyclic polylactates, produced by

Lactobacillus harbinensis K V9.3.1Np in Yogurt. Front. Microbiol. 9, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2018.02252

Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., Thonart, P., 2011. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the Weissella Genus Isolated from Food. J. Food Sci. 76. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x

Ouiddir, M., Bettache, G., Leyva Salas, M., Pawtowski, A., Donot, C., Brahimi, S., Mabrouk, K., Coton, E., Mounier, J., 2019. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. Food Microbiol. 82, 160–170. doi:10.1016/j.fm.2019.01.020

Pitt, J., Hocking, A., 2009. Fungi and food spoilage, third. ed. Springer US. doi:10.1007/978-0-387-92207-2

Salas, M.L., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., Coton, E., 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. Front. Microbiol. 9, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2018.01787

Schwenninger, S.M., Meile, L., 2004. A Mixed Culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Inhibits Food Spoilage Yeasts. Syst. Appl. Microbiol. 27, 229–237. doi:10.1078/072320204322881853

Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J., Kenne, L., 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7554–7557. doi:10.1128/AEM.69.12.7554–7557.2003

Stiles, M., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 70, 331–345. doi:10.1007/BF00395940

Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., Schnürer, J., 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4322–7. doi:10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002

Yang, X., Li, J., Shi, G., Zeng, M., Liu, Z., 2019. Improving 3-phenyllactic acid production of *Lactobacillus plantarum* AB-1 by enhancing its quorum-sensing capacity. J. Food Sci. Technol. 56, 2605–2610. doi:10.1007/s13197-019-03746-1

Figure legends

Figure 1: Growth of *P. chrysogenum* strain 3674 after 14 days at 25°C on milk agar inoculated previously with *L. rhamnosus* 5326 (active ++) (A) or *L. paracasei* 6363 (inactive -)(B).

Figure 2: Activity of *L. rhamnosus* 5326 (active ++) (A) or *L. paracasei* 6363 (inactive -) (B) against the indicator yeast *C. intermedia* 3669

Figure 3: Growth of *Candida lusitaniae* 3668 in CMM in presence of selected *lactobacilli* after 1, 14 and 21 days at 7°C. Control -: no *Lactobacillus* added.

Figure 4: SPME-GC-MS analysis of CMM without biopreservative strains (A), with *L. casei* 7006 (B) and *L. casei* 6960 (C). 1: diacetyl, 2: acetoin, 3: acetic acid, 4: 2,3 butanediol.

Figure 1

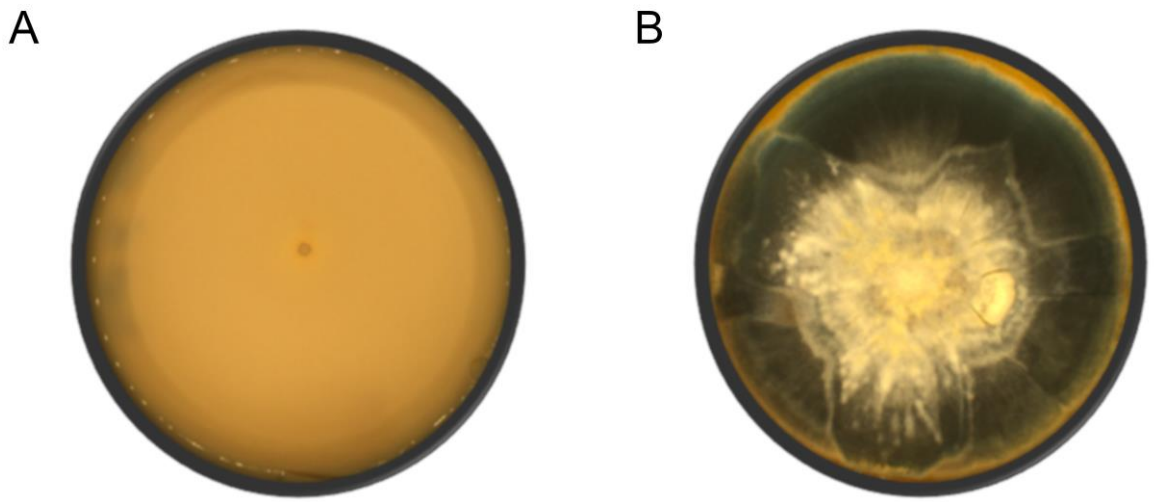


Figure 2

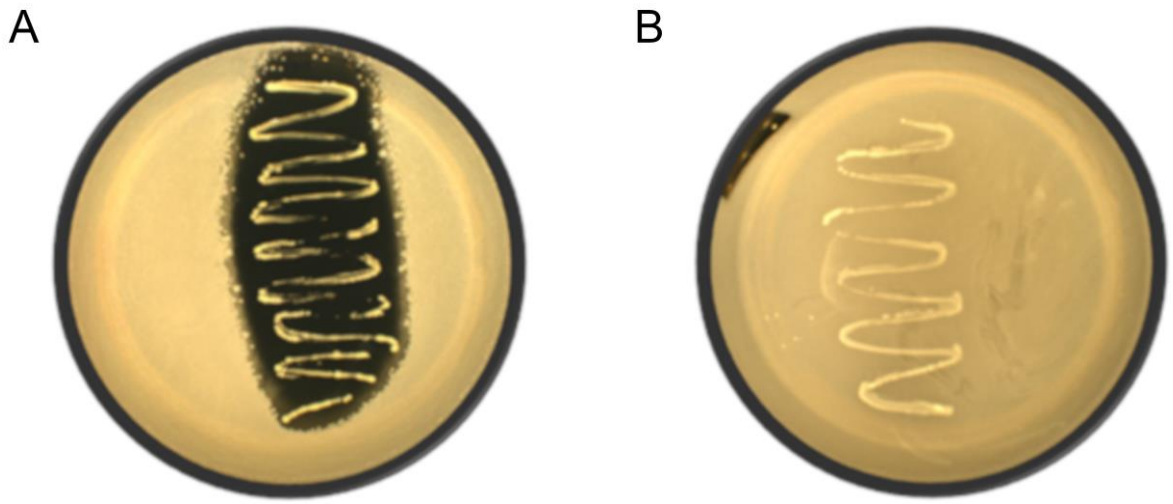


Figure 3

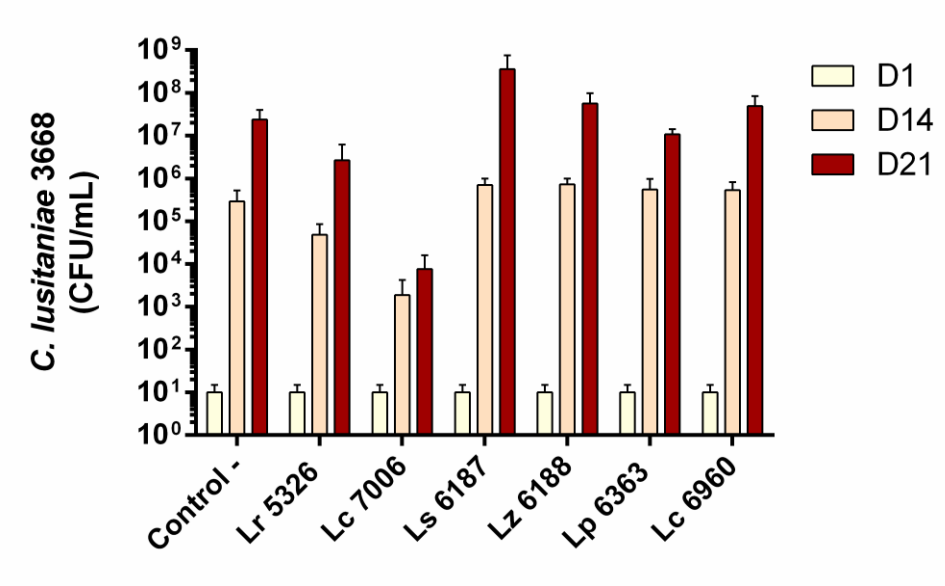

C. lusitaniae 3668
(CFU/mL)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
D1
D14
D21
Control -
Lr 5326
Lc 7006
Ls 6187
Lz 6188
Lp 6363
Lc 6960

Figure 4

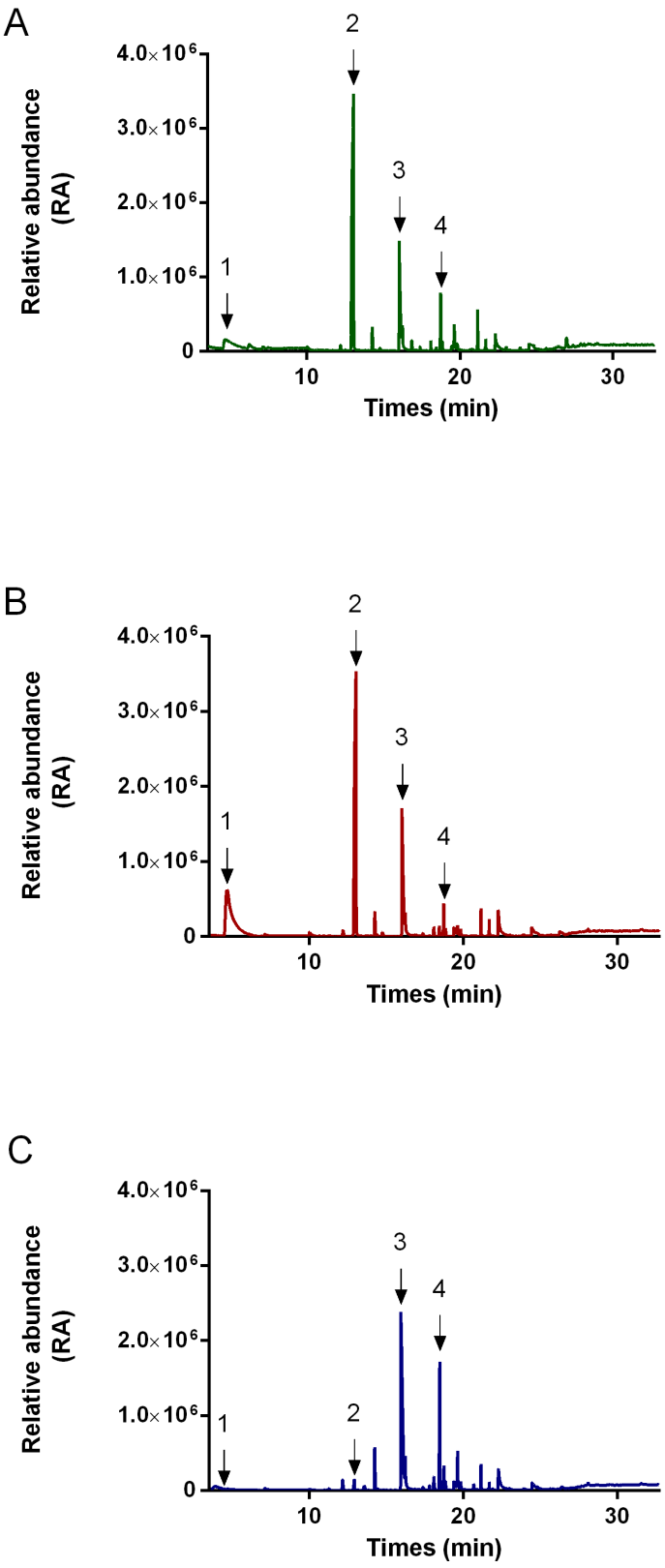

A
B
C
Relative abundance (RA)
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
10
20
30
Times (min)
1
2
3
4

Table 1: Activity of selected *Lactobacillus* strains, determined by agar spot tests, against molds isolated from dairy products.

Isolate		Filamentous mold targets				
Species	Strain	*P. crustosum* 3673	*P. chrysogenum* 3674	*P. roqueforti* 3675	*A. niger* 4624	*Mucor sp.* 3652
Lactobacillus rhamnosus	5326	+	++	+	++	-
Lactobacillus rhamnosus	5718	+	++	-	++	-
Lactobacillus rhamnosus	6311	+	++	+	++	-
Lactobacillus plantarum	5329	+	-	-	+	-
Lactobacillus plantarum	5711	+	+	-	++	-
Lactobacillus plantarum	1096	-	+	-	+	-
Lactobacillus plantarum	6402	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	7006	+	++	+	++	-
Lactobacillus casei	6960	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	6575	+	++	-	++	-
Lactobacillus paracasei	6363	-	-	-	-	-
Lactobacillus spicherii	6187	-	-	-	-	-
Lactobacillus zymae	6188	+	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	5661	+	++	+	++	-
Lactobacillus sp.	6630	+	+	-	++	-
Lactobacillus sp.	6660	+	++	-	++	-
Lactobacillus sp.	6795	+	++	+	++	-
Lactobacillus sp.	6796	+	++	-	++	-

(++: total growth inhibition , +: weak growth, -: no growth inhibition)

Table 2: Activity of selected *Lactobacillus* strains, determined by agar overlay tests, against yeasts isolated from dairy products

Isolate		Yeast targets			
Species	Strain	*R. mucilaginosa 3671*	*C. intermedia 3669*	*C. lustianiae 3668*	*S. boulardii* 3667
Lactobacillus rhamnosus	5326	++	++	+	-
Lactobacillus rhamnosus	5718	++	++	-	-
Lactobacillus rhamnosus	6311	-	++	+	-
Lactobacillus plantarum	5329	+	++	-	-
Lactobacillus plantarum	5711	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum	1096	+	++	-	-
Lactobacillus plantarum	6402	-	+	-	-
Lactobacillus casei	7006	++	++	+	-
Lactobacillus casei	6960	-	-	-	-
Lactobacillus casei	6575	-	-	-	-
Lactobacillus paracasei	6363	-	-	-	-
Lactobacillus spicheri	6187	++	++	+	-
Lactobacillus zymae	6188	++	++	+	-
Lactobacillus sp.	5661	+	+	-	-
Lactobacillus sp.	6630	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	6660	-	-	-	-
Lactobacillus sp.	6795	++	++	+	-
Lactobacillus sp.	6796	+	+	-	-

(++: growth inhibition > 0.5 cm, +: growth inhibition < 0.5 cm, -: no growth inhibition)

Table 3: Final count of lactobacilli in CMM after fermentation.

Data depicted here are results and standard deviations corresponding to 3 replicates.

Species	Strain	*Lactocbacillus* (log_{10}CFU/mL)			
		0 h		18 h	
		Mean	SD	Mean	SD
L. rhamnosus	5326	6,6	0,1	7,3	0,2
L. casei	7006	6,9	0,1	7,7	0,3
L. spicheri	6187	6,2	0,1	7,5	0,3
L. zymae	6188	6,4	0,0	7,4	0,1
L. paracasei	6363	6,7	0,1	7,7	0,2
L. casei	6960	6,7	0,1	7,8	0,3

Table 4: Growth of lactobacilli, antifungal activity (expressed as growth of the target C. lusitaniae 3668), pH, concentration of organic acids (g/L*, µg/mL**) detected in CMM. HICA: (S)-2-hydroxyisocaproic acid, PLA: Phenyllactic acid, BA: Benzoic acid, OH-PLA: DL-p-hydroxyphenyllactic.

Data depicted here are results and standard deviations corresponding to 3 independent replicates.

Species	Strain	Days	*Lactocbacillus* (log_{10}CFU/mL)			Growth of target (log_{10}CFU/mL)			pH			Lactic acid*			Acetic acid*			HICA**			PLA**			BA**			OH-PLA**		
			Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD
Not inoculated		14	0	+/-	0	5,2	+/-	0,7	4,3	+/-	0,0	10,3	+/-	0,9	ND	+/-	ND	45,2	+/-	7,4	10,6	+/-	2,0	0,0	+/-	0,0	1,1	+/-	0,4
		21	0	+/-	0	7,3	+/-	0,3	4,3	+/-	0,0	10,5	+/-	1,2	ND	+/-	ND	39,2	+/-	8,4	10,6	+/-	1,0	0,0	+/-	0,0	1,5	+/-	0,5
L. casei	7006	14	8,2	+/-	0,1	3,0	+/-	0,6	4,0	+/-	0,0	11,5	+/-	0,7	ND	+/-	ND	54,2	+/-	5,2	9,3	+/-	2,7	12,2	+/-	2,7	2,8	+/-	1,0
		21	8,4	+/-	0,1	3,7	+/-	0,5	4,1	+/-	0,1	13,7	+/-	1,0	ND	+/-	ND	57,7	+/-	2,7	10,7	+/-	0,4	13,6	+/-	2,9	4,0	+/-	0,8
L. casei	6960	14	7,8	+/-	0,2	5,7	+/-	0,2	4,1	+/-	0,0	10,3	+/-	0,5	ND	+/-	ND	43,9	+/-	9,6	11,4	+/-	0,5	11,4	+/-	0,9	3,8	+/-	0,6
		21	7,6	+/-	0,1	7,5	+/-	0,5	4,2	+/-	0,0	9,8	+/-	1,0	ND	+/-	ND	46,7	+/-	17,8	15,6	+/-	0,6	13,1	+/-	2,1	6,1	+/-	0,8

Table 5: Fatty acids recovered after extraction from CMM (+: presence).

Standard (methyl-)	Length of the carbon chain	RT (min)	Control -	*Lc* 7006	*Lc* 6960
Dodecanoic acid	**C12:0**	4,3	+	+	+
Tetradecenoic acid	**C14:1**	4,9	+	+	+
Tetradecanoic acid	**C14:0**	4,94	+	+	+
Hexadecanoic acid	**C16:0**	5,85	+	+	+
Heptadecanoic acid	**C17:0**	6,45	+	+	+
Octadecatrienoic acid	**C18:3**	6,85	+	+	+
Octadecenoic acid	**C18:1**	7	+	+	+
Docosanoic acid	**C22:0**	11,24	+	+	+
Tricosanoic acid	**C23:0**	12,35	+	+	+
Tetracosanoic acid	**C24:0**	12,93	+	+	+

Annexe 2 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche A1 (*L. rhamnosus* 5326).

Molécules	**MRS-Glc**		**MRS-Lac**		**Lait**	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	20.56	1,35	16,23	3,94	16,04	0,23
Acide acétiqué	1,56	0,11	1,30	0,12	0,00	0,00
Acide DL-p-Hydroxyphényllactique	8,48	1,07	9,39	24,77	3,31	0,42
Acide 4-Hydroxybenzoïque	Trace		0,25	0,23	/	
Acide vanillique	2,17	0,84	3,92	3,90	/	
Acide phényllactique	57,38	5,24	37,75	11,80	2,47	0,36
Acide salicylique	Trace		Trace		/	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	101,23	3,43	157,79	32,15	85,75	8,94
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Annexe 3 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. casei* 7006.

Molécules	**MRS-Glc**		**MRS-Lac**		**Lait**	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	22,80	0,42	18,48	2,43	18,75	0,19
Acide acétique	1,60	0,13	1,32	0,25	0,00	0,00
Acide DL-p-Hydroxyphenyllactique	10,53	1,05	9,92	3,62	3,31	0,42
Acide 4-Hydroxybenzoïque	Trace		0,20	0,22	/	
Acide vanillique	/		1,56	2,11	/	
Acide phénýllactique	70,14	8,53	46,84	15,50	2,47	0,39
Acide benzoïque	/		/		12,65	3,15
Acide salicylique	Trace		Trace		/	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	127,47	18,48	202,77	40,72	85,75	8,94
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Annexe 4 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. spicheri* 6187.

Molécules	MRS-Glc		MRS-Lac		Lait	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	14,94	1,72	17,47	0,4	2,15	0,18
Acide acétique	1,77	0,31	1,90	0,15	9,03	0,34
Acide DL-p-Hydroxyphényllactique	8,86	1,61	9,90	3,16	Trace	
Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique	Trace		Trace		Trace	
Acide 4-hydroxybenzoïque	0,11	0,056	0,25	0,26	Trace	
Acide caféïque	/		/		2,07	0,66
Acide vanillique	3,39	2,20	4,64	4,64	/	
Acide phénylactique	76,35	7,05	64,46	19,92	0,58	0,42
Acide salicylique	Trace		Trace		/	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	50,52	3,14	141,03	28,89	2,91	1,42
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Annexe 5 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. zymae* 6188.

Molécules	MRS-Glc		MRS-Lac		Lait	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	25,37	0,48	23,32	0,56	6,62	0,17
Acide acétique	1,74	0,03	1,87	0,12	0,00	0,00
Acide DL-p-Hydroxyphenyllactique	84,19	22,95	68,61	18,62	/	
Acide 4-hydroxybenzoïque	Trace		0,15	0,18	0,11	0,08
Acide phényllactique	138,91	24,91	107,10	25,30	1,90	0,48
Acide benzoïque	/		/		19,60	2,52
Acide salicylique	Trace		Trace		Trace	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	102,94	25,94	246,43	43,90	4,11	0,80
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Annexe 6 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. paracasei* 6363.

Molécules	**MRS-Glc**		**MRS-Lac**		**Lait**	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	16,13	1,04	4,73	0,14	2,35	0,03
Acide acétique	1,60	0,17	1,94	0,19	0,00	0,00
Acide DL-p-hydroxyphenyllactique	0,93	0,47	Trace		0,32	0,17
Acide 4-hydroxybenzoïque	0,12	0,18	/		0,13	0,22
Acide vanillique	4,00	2,03	7,70	5,98	/	
Acide phényllactique	7,76	1,22	1,81	1,41	0,87	0,12
Acide salicylique	Trace		Trace		/	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	19,53	0,31	4,81	5,78	6,98	0,70
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Annexe 7 : Influence du milieu de culture MRS-Glc, MRS-Lac et lait sur la production d'acide minoritaires chez la souche *L. casei* 6960.

Molécules	**MRS-Glc**		**MRS-Lac**		**Lait**	
	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type	Concentration (µg/mL)	Ecart type
Acide lactique	10,18	1,80	16,31	0,17	1,95	0,07
Acide acétique	1,23	0,08	1,75	0,20	0,00	0,00
Acide DL-p-Hydroxyphenyllactique	5,34	0,14	5,65	2,02	Trace	
Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique	Trace		Trace		Trace	
Acide 4-Hydroxybenzoïque	0,06	0,06	0,20	0,18	Trace	
Acide caféique	/		/		2,09	0,62
Acide vanillique	3,79	1,63	3,35	2,39	/	
Acide phénylactique	64,91	0,75	57,66	19,31	0,33	0,30
Acide benzoïque	Trace		/		/	
Acide salicylique	Trace		Trace		/	
Acide (S)-2-hydroxyisocaproïque	22,62	8,79	77,80	22,20	5,18	0,12
Acide azelaïque	Trace		Trace		Trace	

Résumé : Tout au long du processus de transformation et de stockage, les matières premières alimentaires sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes. On estime que 5 à 10 % de la production alimentaire mondiale est perdue du fait de la prolifération de levures et/ou moisissures au sein de ces matrices. L'industrie laitière est la deuxième filière agro-alimentaire au monde et celle-ci n'est pas épargnée par ces contaminations. Pour résoudre cette problématique et répondre à la demande grandissante des consommateurs visant à éliminer les conservateurs chimiques dans les produits alimentaires, la biopréservation par des ferments bactériens représente la meilleure alternative. Dans cette étude, l'activité antifongique de 18 souches de lactobacilles contre des contaminants de produits laitiers a été analysée. Quatre souches du genre *Lactobacillus* présentant le spectre d'inhibition le plus large ont ainsi été sélectionnées. La caractérisation des molécules antifongiques produites a été réalisée à partir de cultures en milieu MRS, milieu lait et en challenge test, révélant une synergie entre l'acide lactique et d'autres molécules. Celles-ci se sont révélées faiblement produites et correspondent à des acides organiques issus de la dégradation d'acides aminés (acide phényllactique, acide benzoïque, …), des acides gras et des molécules volatiles ou semi-volatiles (diacétyle, acide acétique, …). La production de ces molécules antifongiques par des souches actives et inactives a été comparée en challenge tests. Ceci a permis de mettre en évidence l'augmentation de la quantité de diacétyle, d'un facteur 10, lorsque la souche active *L. casei* 7006 est associée aux ferments d'acidification (deux souches de *Lactococcus lactis*). Ainsi, l'accroissement de la production de cette molécule représente une piste prometteuse pour la biopréservation de produits laitiers en plus d'un éventuel bénéfice aromatique pour certains produits (cheddar, …).

Mots clés : biopréservation, ferments bactériens, antifongiques, produits laitiers

Summary: Throughout the processing and storage process, food raw materials are likely to be colonized by micro-organisms. About 5 to 10% of global food production is lost due to the proliferation of yeasts and/or molds within these matrices. The dairy industry is the second largest food industry in the world and is not immune to this contamination. To solve this problem and meet the growing demand of consumers to get rid of chemical preservatives in food, biopreservation with bacterial ferments is the best alternative. In this study, the antifungal activity of 18 strains of *Lactobacillus* against dairy products spoilers was analyzed. Four strains displaying the broadest inhibition spectrum were selected. Antifungal molecules from cultures in MRS medium, milk medium and fresh cheese were analysed, revealing synergy between lactic acid and other molecules. The latter have been found to be weakly produced and correspond to organic acids resulting from the degradation of amino acids (phenyllactic acid, benzoic acid,...), fatty acids and volatile or semi-volatile molecules (diacetyl, acetic acid,...). Their production by active and inactive strains has been compared in challenge tests, leading to the observation of a ten times increase of diacetyl detection, in presence of *L. casei* 7006 compared to the control. Thus, increasing diacetyl production within dairy products could be beneficial for biopreservation, as well as for taste of some cheeses like cheddar.

Keywords: biopreservation, biopreservative cultures, antifungal, dairy products