



DEPARTEMENT DE BILOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Messalti Mehdi

Boulakhras Ibrahim

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

THÈME

**L'étude de l'activité antifongique des bactéries
lactique vis-à-vis des champignons phytopathogènes
d'*Alternaria alternata*.**

Soutenu publiquement le 03/07/2018

DEVANT LE JURY

| | | | |
|--------------|--------------------------|------------|---------------|
| Président | Mme CHOUGRANI fadela | Prof | U. Mostaganem |
| Encadreur | Mr CHERIGUENE Abderrahim | Prof | U. Mostaganem |
| Co encadreur | Mr ZABOURI Younes | MAA | U. Mostaganem |
| Examineurs | Mme ZERGOUG Amina | Doctorante | U. Mostaganem |

*Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie au niveau de l'université de
Mostaganem*

2017 _ 2018

Remerciements

Au début et avant tout, le remerciement et louange à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail

Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.

Tout d'abord, nous remercions notre encadreur **Mr CHERIGUENE Abderrahim**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, de nous avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants.

Nos remerciements les plus sincères vont à **Mr ZABOURI Younes**, MAA à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem* pour l'honneur qu'elle nous a fait en codirigeant ce travail, nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses conseils et pour son écoute attentive tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions **Mme CHOUGRANI Fadela**, professeur, à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem* pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nous remercions également **Mme ZERGOUG Amina**, doctorant à l'université de *Mostaganem* d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial s'adresse aux techniciens des Laboratoires de Microbiologie, à **Mr Mohammed, Mme Hafida** et **Mr Djilali** merci pour vos conseils.

En fin, nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents en témoignage de ma connaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien toute au long de mes études. Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que

Dieu vous bénisse et vous protège.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup.

A mes frères Smail et Fadila

A mes très chères amies Amina et Abd elkadar.

A tous mes collègues et mes camarades.

A tous ceux que je porte dans mon coeur.

Mehdi

Dédicace

Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH « الله » qui m'a aidé et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui ont été toujours à mes côtés, pour leur générosité leurs sacrifices et le courage qu'ils m'ont donné pour terminer mes études.

Grand merci

Je vous aime beaucoup.

A toutes mes frères.

A tous mes collègues d'études.

A tous ceux que je porte dans mon coeur.

IBRAHIM

Résumé

L'objectif de notre travail consiste à tester l'activité antifongique des bactéries lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes en étudiant différents paramètres pouvant être à l'origine de l'augmentation de la production des bactériocines. L'étude des caractéristiques macroscopique, microscopique, et physiologiques de nos bactéries et champignons.

La préservation des aliments se base essentiellement sur le retard, ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants, et l'activité antifongique des bactéries lactiques est l'une des propriétés technologiques recherchées. L'effet antifongique a été recherché par la méthode de confrontation chez 5 souches de bactéries lactiques, isolées du lait cru de chamelle et de chèvre. Environ 100% des isolats ont montré une activité inhibitrice contre *Alternaria alternata*. Quatre d'entre elles, appartenait au genre *Enterococcus faecium*. Les souches d'*Enterococcus faecium* 35/14.2/4.19, une souche de *Lactobacillus plantarum* 4.18 et une souche d'*Enterococcus lactis*(10) produisent des composés antifongiques actifs contre *Alternaria alternata*. Un changement dans les zones d'inhibition a été détecté après traitement par des enzymes protéolytiques, par contre après un chauffage, par réfrigération et par congélation. Une inhibition a été observée.

Une inhibition totale a été observée à pH 7 pour toutes les souches et une diminution de l'inhibition dans des valeurs de pH 2, 4, ceux-ci suggèrent la contribution des bactériocines dans l'activité antifongique parce que leur activité dépend du pH neutre. Le pH influe sur le métabolisme de *Lb. Plantarum* et *enterococcus faecium* et *Enterococcus lactis* qui ont montré une production maximale de composés antifongiques lorsqu'elles sont cultivées à pH 7 et une production modérée dans le pH 9 est minimale à pH 2.

Lactobacillus plantarum inhibent la germination des spores et la croissance de mycélium, et provoquent des malformations au niveau du thalle, conidiophore et la spore d'*Alternaria alternata*.

Mots clés: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, substances antifongiques, *Alternaria alternata*, biopréservation.

Abstract

The objective of our work is to test antifungal activity of lactic bacteria against phytopathogenic fungi by studying different parameters that could be at the origin of the increase in the production of bacteriocins. The study of macroscopic characteristics, microscopic, and physiological of our bacteria and fungi.

The preservation of foods is essentially based on the delay, or inhibition of the growth of contaminating microorganisms, and the antifungal activity of lactic acid bacteria is one of the desired technological properties. The antifungal effect was investigated by the confrontation method in 5 strains of lactic acid bacteria, isolated from raw camel milk and goat's milk. About 100% of the isolates showed inhibitory activity against *Alternaria alternata*. Four of them belonged to the genus *Enterococcus facium*. Strains of *Enterococcus facium* 35/14.2/ 4.19 and a strain of *Enterococcus lactis* and a strain *Lactobacillus plantarum* 4.18 produce antifungal compounds active against *Alternaria alternata*. A change in the inhibition zones was detected after treatment with proteolytic enzymes, but after heating, by refrigeration and by freezing Inhibition was observed.

Total inhibition was observed at pH 7 for all strains and a decrease in inhibition at pH 2, 4 values, these suggest the contribution of bacteriocin in antifungal activity because their activity depends on the neutral pH .pH affects the metabolism of *Lb. Plantarum* and *enterococcus facium* that showed maximum production of antifungal compounds when grown at pH 7 and moderate production in pH 9 is minimal at pH 2.

Lactobacillus plantarum inhibit spore germination and mycelial growth, and cause malformations in the thallus, conidiophore and *Alternaria alternata* spore.

Key words: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, antifungal substances, *Alternaria alternata*, biopreservation.

ملخص

الهدف من عملنا هو اختبار النشاط المضاد للفطريات للبكتريا اللاكتيكية ضد الفطريات الضارة عن طريق دراسة معايير مختلفة يمكن أن تكون في الأصل من الزيادة في إنتاج البكتريوسينات. دراسة الخصائص العيانية ، الميكروسكوبي والفسولوجي للبكتيريا والفطريات

حفظ الأغذية التي تقوم أساسا على التأخير أو منع نمو الكائنات الدقيقة الملوثة، ونشاط مضاد للبكتيريا حمض اللبنيك هي واحدة من الخصائص التكنولوجية المطلوبة. تم دراسة التأثير المضاد للفطريات بواسطة طريقة المواجهة في 5 سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الإبل الخام وحليب الماعز. حوالي 100 ٪ من العزلات أظهرت نشاط مثبط سلالات من المكورات المعوية *Eterococcus facium*. أربعة منهم ينتمي إلى جنس *Alternaria alternata* ضد وسلالة من المكورات المعوية اللبنية (10) إنتاج *plantarum* 4.18 ، سلالة من الملبنة 35 / 14.2 / 4.19 *facium* المركبات المضادة للفطريات نشطة ضد المتناوبة النوباء، تم الكشف عن تغيير في مناطق تثبيط بعد العلاج بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين، من ناحية أخرى بعد التسخين، عن طريق التبريد والتجميد، وقد لوحظ تثبيط

لوحظ منع الكامل عند pH 7 لجميع السلالات وانخفاض في المنع عند قيم pH 2 و 4، وهذا يشير إلى مساهمة البكتريوسين في النشاط المضاد لأن نشاطها يعتمد على درجة الحموضة المحايدة. يؤثر على استقلاب Lb. البوتاسيوم والمكورات المعوية والفاشفة والمكورات المعوية التي أظهرت الحد الأقصى من إنتاج المركبات المضادة للفطريات عندما نمت في pH 7 والإنتاج المعتدل في pH 9 هو الحد الأدنى في pH 2.

Lactobacillus plantarum يثبط إنبات الجراثيم ونمو المفترس ، ويسبب تشوهات في المهاد العضلي ، و *Alternaria alternata* spore و conidiophore

الكلمات المفتاحية: *Alternaria alternata* ، antifungal substances ، *Eterococcus* ، *Lactobacillus* ، biopreservation

LISTE DES ABRÉVIATIONS

PDA : potato desxtrose agar.

4.18 : *lactobacillus plantarum*.

C : Control

LAB : bactéries lactique.

Entéro : *Enterococcus*.

Fig. : Figure.

Tab : Tableau.

Leu : *Leuconostoc*.

Strep : *Streptococcus*.

Lacto : *Lactococcus*.

Ch : Champignons.

S : Souche.

LB : *Lactobacillus*.

N.D : Non Déterminé.

V : Variable.

ESe : hydrolyse de l'esculine.

Ag.D : Antigène D.

ADN : acide désoxyribose nucléaire.

ARNr : acide ribonucléase ribosomique.

g : gramme.

°C : degré Celsius.

Ph : Potentiel d'hydrogène.

sp : espèce.

MRS : De man, Rogosa and Sharpe.

Min : minute.

ml : millilitre.

mM : mili-molaire.

ul : microlitre.

LISTE DES FIGURES :

- Figure N° 01 :** Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles (De Vos et al, 2009) :
A : *Lactobacillus gasserii*; B : *Lactobacillus agilis*; C : *Lactobacillus curvartus*; D, *Lactobacillus mineur*;
E : *Lactobacillus fermentum*; et F, la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir05
- Figure N°02 :** Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Lactobacillus* basée sur les séquences des gènes ARNr 16S (Zhang et Cai, 2014).....07
- Figure N°03 :** *Lactococcus lactis subsp lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).....11
- Figure N° 04 :** Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De ROISSART et LUQUET,1994)17
- Figure N° 05 :** Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d'*Alternaria alternata* (Simmons, 1999 ; Taralova et al., 2011).....26
- Figure N° 06 :** Symptômes de l'alternariose: **A.** taches sur foliole de tomate provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata*(sensu lato); **B.** taches sur feuilles de pomme de terre provoquées par *A. solani* et *A. alternata*(sensu lato).....29
- Figure N° 07 :** Lésions provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata*; **A.** sur tige, **B.** sur collet.....29
- Figure N° 08 :** Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par *Alternaria tomatophila*(**A**) et par *A. solani*(**B**), *A. arborescens* et *A. alternata*(**C**).....30
- Figure N° 09 :** Cycle infectieux de l'Alternariose.....32
- Figure N° 10 :** Le processus d'infection, le développement et les symptômes des maladies causées par *Alternaria* pathogènes des *Solanacées* (Agrios, 2005 ; Chaerani et Voorrips, 2006).....32
- Figure N° 11 :** Schématisation du protocole de conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à l'aide de cryobilles.....35
- Figure N° 12 :** Schématisation du protocole de conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à partir d'implants de gélose.....35
- Figure N° 13 :** Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (Badis et al.,2003).....37
- Figure N° 14 :** Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Badis et al.,2005).....38

| | |
|--|--------------|
| Figure N°15 : Les différentes méthodes utilisées pour la recherche de substances antimicrobienne..... | 41 |
| Figure N°16: Aspect macroscopique des souches lactiques en milieu MRS solide..... | 43 |
| Figure N°17 : Observation microscopique de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> (A) et <i>Enterococcus faecium</i> (B) après coloration de Gram (G x100)..... | 44 |
| Figure N° 18 : Résultat de test de la catalase..... | 44 |
| Figure N°19 : Evaluation des caractères morphologique microscopique <i>Alternaria alternata</i> | 45 |
| Figure N° 20 : <i>Alternaria alternata</i> sur microscope..... | 46 |
| Figure N° 21 : schéma explicative d'un champignon <i>Alternaria alternata</i> (BOTTON et al, 1990)..... | 46 |
| Figure 22 Activité antifongique par confrontation. Trois Souches d' <i>Eterococcus faecium</i> (4.19, 35 et 14.2) et une souche de <i>Lactobacillus Plantarum</i> (4.18) et une souche d' <i>Eterococcus lactis</i> (10)..... | 47/48 |
| Figure 23 : Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les champignons phytopathogènes..... | 49 |
| Figure 24 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Aalternaria alternata</i> sp. Par les métabolites des lactobacillus plantarum et Enterococcus faecium..... | 50 |
| Figure 25 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Aalternaria alternata</i> sp. Par les métabolites traité par déférent la chaleur des lactobacillus plantarum et Enterococcus faecium..... | 51 |
| Figure 26 : effet des enzymes protéolytique de l'activité antifongique..... | 52 |
| Figure 27 : L'effet du pH de milieu sur les substances antifongiques produites par <i>lactobacillus plantarum</i> et <i>Eterococcus faecium</i> | 54 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| Tableau N° 1 : Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire (Haydersah, 2010) | 06 |
| Tableau N° 02 : Liste des espèces du genre <i>leuconostoc</i> (Zhang et Cai, 2014) | 09 |
| Tableau N° 03 : caractéristiques physiologiques des espèces appartenant au genre <i>Enterococcus</i> | 12 |
| Tableau N° 04 : Caractéristiques des genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> d'après (Guiraud, 1998)..... | 14 |
| Tableau N° 05 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (SPINNLER,1995)..... | 16 |
| Tableau N° 06 : Quelques antagonistes microbiens utilisés pour le control des <i>Alternaria</i> spp. Sur fruits et légumes..... | 34 |
| Tableau N° 07 : déchiffrage des souches lactique..... | 36 |
| Tableau N° 08 : Caractéristiques morphologiques d' <i>Alternaria alternata</i> | 45 |
| Tableau N° 09 : Activité antifongique par confrontation..... | 39 |

INTRODUCTION

Introduction :

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la fermentation de différents aliments. Leur capacité à produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH est le majeur facteur par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacetyl sont synthétisés par les bactéries lactiques. De plus ces dernières peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines. L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes.

Les antagonistes doivent être capables d'assurer sainement la biopréservation, et tolérables par l'homme et les animaux, parmi ceux-ci, les bactéries lactiques, non seulement connues pour leur innocuité, mais aussi pour leurs activités antimicrobiennes, pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (Djossou *et al.*, 2011).

. Les principaux facteurs déterminant la croissance fongique sur un produit alimentaire sont l'activité de l'eau (A_w), la température, le pH, l'oxygène, la lumière et la présence d'autres microorganismes, qui peuvent restreindre la croissance fongique et la synthèse de mycotoxines.

La contamination fongique limite la durée de conservation, et provoque des modifications physiques (moisissure visible ou décoloration, goût, odeur de moisi) et des modifications des qualités nutritives.

Parmi les champignons toxigènes qui contaminent les légumes, les fruits appartiennent au genre *alternaria*, De cela, la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques, capables d'être utilisées comme des agents de biopréservation, afin de réduire les pertes engendrées dans les cultures et l'industrie agroalimentaire, et l'effet néfaste des champignons et leurs mycotoxines, semble être l'un des outils les plus recherchés.

Dans ce contexte, le but de ce travail est la sélection des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Enterococcus*, isolées de différents produits pouvant inhiber la croissance d'*Alternaria* sp. et la caractérisation des composés responsables de l'inhibition. (LAREF Nora., 2014).

- La première partie consiste à revivifier et repiquer les bactéries lactiques et les champignons dans leurs milieux appropriés.
- Dans la deuxième partie, une orientation de l'identification des bactéries lactiques et les champignons établie, en ce en réalisant des tests physiologiques et des observations micro et macroscopique.
- Dans la troisième partie, la recherche de l'activité antagoniste des souches lactiques vis à vis *alternaria alternata*.
- Et enfin, changement de certain paramètre pour caractérise le composé responsable de l'inhibition.

Table des matière

ملخص

Résumer

Abstract

Abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 01

Partie bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

| | |
|---|----|
| I. Les bactéries lactiques | 02 |
| 1. Historique | 02 |
| 2. Généralités..... | 02 |
| 3. Habitat | 03 |
| 4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques | 03 |
| 5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques | 04 |
| 5.1.Le genre <i>Lactobacillus</i> | 04 |
| 5.2.Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella Fructobacillus</i> | 07 |
| 5.2.1. Le genre <i>Leuconostoc</i> | 08 |
| 5.2.2. Le genre <i>Weissella</i> | 09 |
| 5.2.3. Le genre <i>Oenococcus</i> | 10 |
| 5.3.Les genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> | 10 |
| 5.3.1. Le genre <i>Lactococcus</i> | 10 |
| 5.3.2. Le genre <i>Enterococcus</i> | 11 |
| 5.3.3. Le genre <i>Streptococcus</i> | 13 |
| 6. Utilisation et application | 15 |
| 7. Fermentation lactique..... | 16 |
| 7.1.Voie homofermentaire..... | 17 |
| 7.2.Voie hétérofermentaire | 17 |
| 7.3.Voie fermentaire bifide..... | 17 |
| 8. Interaction avec d'autres micro-organismes | 17 |
| 8.1.Activité antifongique | 18 |
| 8.2.Les lactobacilles et l'inhibition fongique | 18 |
| 8.3.Les substances antifongiques | 18 |
| 8.4.Les acides organiques | 19 |
| 8.5.Peroxyde d'hydrogène | 19 |
| 8.6.Dioxyde de carbone..... | 19 |
| 8.7.Le diacétyle | 19 |
| 8.8.Les bactériocines..... | 20 |
| 8.8.1. Bactériocines produites par des bactéries du genre <i>Enterococcus</i> | 20 |
| 8.8.2. Bactériocines produites par des bactéries du genre <i>Lactobacillus</i> | 20 |
| 9. Propriétés probiotiques | 20 |
| 10. Méthodes de conservation..... | 22 |
| 10.1. Méthodes de conservation des souches lactiques..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 10.1.1. Congélation :..... | 22 |
| 10.1.2. Lyophilisation :..... | 22 |
| 10.1.2.1. Lyophilisation des bactéries lactiques | 23 |
| 11. Exigences nutritionnelles..... | 23 |
| 11.1. Exigences en acides aminés | 23 |
| 11.2. Exigences en bases azotées | 24 |
| 11.3. Exigences en sels minéraux | 24 |
| 11.4. Exigences en cations | 24 |
| 11.5. Exigences en vitamines | 24 |
| 11.6. Exigences en glucides | 24 |
| Chapitre II : <i>Alternaria alternata</i> | |
| 1. Généralités sur les <i>Alternaria</i> | 25 |
| 2. Historique de la taxonomie d' <i>Alternaria</i> | 25 |
| 3. Classification et biologie des <i>Alternaria</i> | 26 |
| 4. La plante hôte | 27 |
| a. Les <i>Solanacées</i> | 27 |
| b. La Tomate | 27 |
| c. La pomme de terre | 27 |
| 5. Les <i>Alternaria</i> pathogènes des <i>Solanacées</i> | 28 |
| 5.1. Symptomatologie | 28 |
| 5.2. Sur feuilles | 28 |
| 5.3. Sur tiges et collets | 29 |
| 5.4. Sur fruits et tubercules | 30 |
| 6. Cycle infectieux | 30 |
| 6.1. Conservation, sources d'inoculum | 30 |
| 6.2. Pénétration et invasion | 31 |
| 6.3. Sporulation et dissémination | 31 |
| 6.4. Conditions favorables à son développement | 32 |
| 7. Méthodes de lutte contre <i>Alternaria</i> | 33 |
| 7.1. La lutte biologique | 33 |
| 8. Conservation des souches de champignons..... | 34 |
| 8.1. Conservation des isolats | 35 |
| <u>Partie expérimental</u> | |
| Chapitre III : Matériel et méthode | |
| I. Matériels | 36 |
| 1. Matériel biologique | 36 |
| • Bactéries lactiques | 36 |
| • Les souches fongiques | 36 |
| 2. Milieux de culture | 36 |
| II. Méthodes | 36 |

| | |
|--|----|
| 1. Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches et leurs appartenances au groupe lactique..... | 36 |
| 2. Conservation des bactéries lactiques | 37 |
| 2.1. Conservation à courte durée | 37 |
| 2.2. Conservation à longue durée | 38 |
| 3. Conservation des souches fongiques | 38 |
| 4. confirmation des bactéries lactiques | 39 |
| 4.1. Tests morphologiques | 39 |
| A. L'aspect macroscopique | 39 |
| B. L'aspect microscopique | 39 |
| 4.2. Tests physiologiques | 39 |
| 5. confirmation des souches fongique | 40 |
| 5.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques | 40 |
| 6. La recherche de l'activité antifongique | 40 |
| 6.1. Préparation de suspension monosporelle | 40 |
| 6.2. Test qualitatif : Méthode de confrontation | 40 |
| 6.3. Test quantitatif : Méthode des puits | 40 |
| 7. Caractérisation des métabolites antifongiques | 41 |
| 7.1. L'effet de la température | 41 |
| 7.2. L'effet des enzymes protéolytiques | 42 |
| 7.3. L'effet du pH | 42 |

Chapitre IV: Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| I. Résultats et discussion | 43 |
| 1. Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique..... | 43 |
| 1.1. Critères morphologiques | 43 |
| 1.2. Tests physiologiques | 44 |
| 2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques <i>d'Alternaria alternata</i> | 44 |
| 2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques | 45 |
| 2.2. Evaluation des caractères morphologiques microscopiques | 45 |
| 3. La recherche de l'activité antifongique..... | 46 |
| 3.1. Méthode de confrontation | 46 |
| 3.2. Méthode des puits | 49 |
| 4. Caractérisation des métabolites antifongiques | 51 |
| 4.1. L'effet de la température | 51 |
| 4.2. L'effet des enzymes protéolytiques | 52 |
| 4.3. L'effet du pH | 53 |
| Discussion générale | 55 |
| Conclusion | 56 |
| Références bibliographiques | 57 |

Annexe

CHAPITRE I

LES BACTÉRIES LACTIQUES

I. : Les bactéries lactiques :

1. Historique :

L'utilisation de la fermentation par l'homme remonte à des temps très anciens. Les premiers produits fermentés ont certainement été obtenus par acidification spontanée des jus végétaux (vins, bières,...) ou par contamination naturelle du lait. Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant J-C dans le croissant fertile au Moyen-Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre). La fermentation des végétaux (vins, bières) et la production de levain apparaissent entre 4000 et 2000 ans avant J-C chez les Egyptiens. La fermentation est réalisée à partir de différents types d'aliments : des végétaux (concombres, betteraves, dattes, jus de fruits, soja, etc...), des produits animaux (viande, lait) ou du poisson. Elle permet de conserver les aliments mais aussi de leur donner une saveur différente du produit original (**Penaud, 2006**).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873. Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé. Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabricant du yaourt à partir des souches de l'institut Pasteur voient le jour (**Penaud, 2006**).

De nos jours, les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine (**Streit, 2008**).

2. Généralités :

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, organotrophes, formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilles (**Badis et al, 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, généralement immobiles, acidotolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Zhang et Cai, 2014**).

Elles rassemblent un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite :

- Homolactique si l'acide lactique produit constitue plus de 90 % des produits de fermentation,
- Hétérolactique facultatives si elles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique,
- Hétérolactique stricte si elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al, 2005 ; Vandamme et al,1996).

La division des BL se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (Salminen et al, 2004; König et Fröhlich, 2009 ;Pringsulaka et al, 2011).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al, 1994; Salminen et al, 2004 ; Zhang et Cai,2014).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles ; C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Dellaglio et al, 1994; Hogg, 2005; Novel, 1993).

Elles sont toutes considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), excepté certaines espèces d'entérocoques et certains ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of Safety) (streit, 2008).

3. Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveu et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001;Hadaf, 2012).Ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe).

4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positif à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, au point de vie enzymatique catalase, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotoleérantes (Laurent et al., 1998), se présentant sous formes différentes, cocci ou bâtonnets (Bourgeois et Larpent, 1996).

Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement

fermentaire les conduisant à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques). Elles ont une faible capacité de biosynthèse (Luquet, 1986).

5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

5.1. Le genre *Lactobacillus*

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*. Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des *Lactobacillaceae*, il comprend actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (Zhang et Cai, 2014).

Il est également très hétérogène, englobant les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologiques. L'hétérogénéité se traduit par la gamme du pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. Cette gamme est de 32 à 55% (Zhang et Cai, 2014).

Nombreuses d'entre elles sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (Dworkin et al, 2006). Ils sont immobiles, asporulés et catalase négative. On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles,...) et de longueur (fig.1). La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène.

Cependant, les principales différences morphologiques entre les espèces restent habituellement clairement reconnaissables. Certaines espèces de lactobacilles produisant du gaz (Par exemple, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus brevis*) présentent toujours un mélange de bacilles longs et courts (Fig.1 - E) (De Vos et al, 2009).

La division cellulaire se produit seulement sur un seul plan. La tendance à former des chaînettes varie selon les espèces et même des souches, ceci dépend de la phase de croissance et le pH du milieu (Zhang et Cai, 2014 ; De Vos et al, 2009).

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53 ° C, avec un optimum entre 30 et 40 ° C (De Vos et al, 2009).

Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5.5 à 6.2 (Zhang et Cai, 2014).

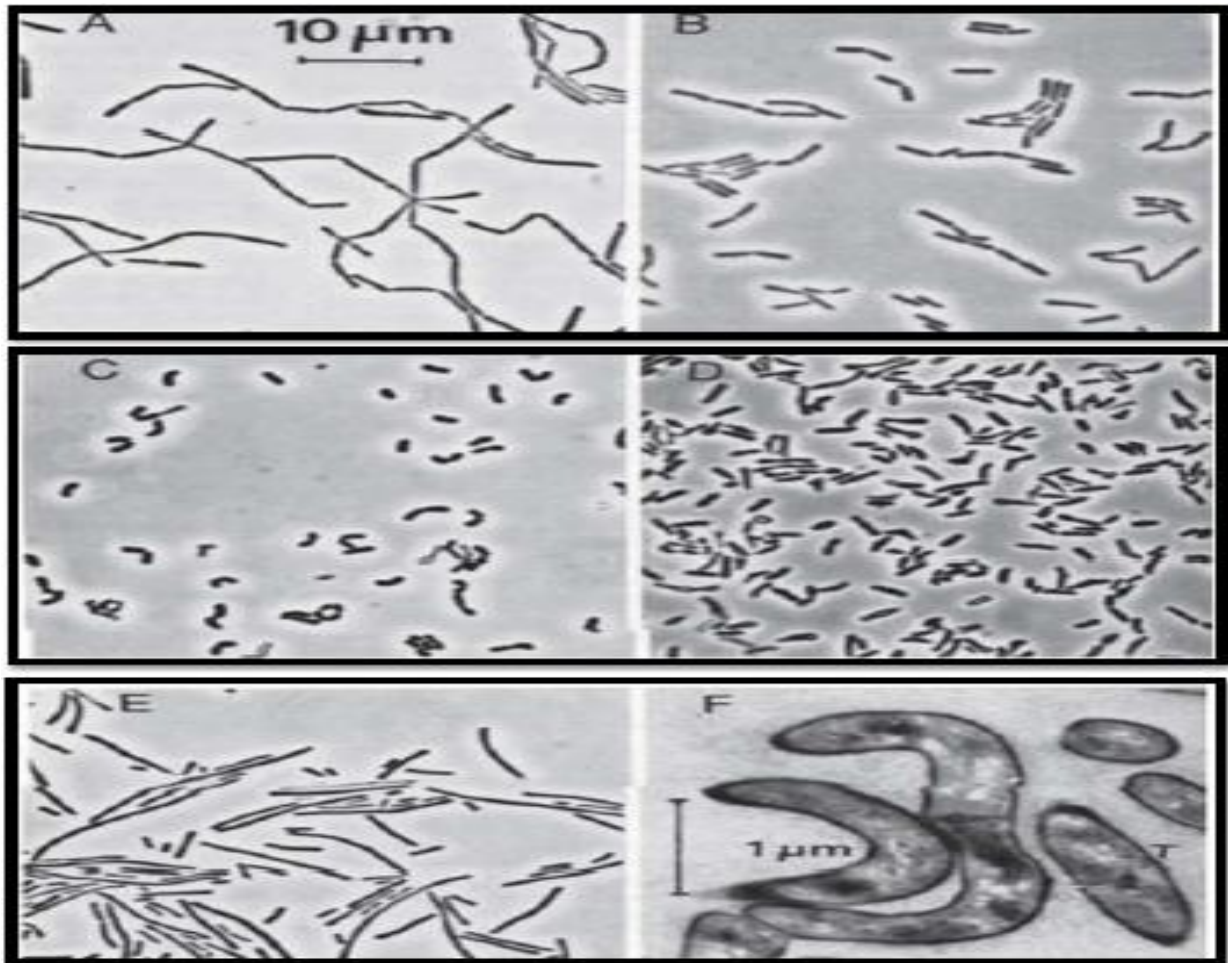


Figure 01 : Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de *Lactobacillus* (De Vos et al, 2009) :

A : *Lactobacillus gasseri*; B : *Lactobacillus agilis*; C : *Lactobacillus curvatus*; D, *Lactobacillus mineur*; E : *Lactobacillus fermentum*; et F, la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir

À l'origine, les espèces du genre *Lactobacillus* ont été regroupés en fonction de leur température de croissance et leurs capacité à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire.

Orla-Jensen (1919) a subdivisé ce groupe d'une manière similaire à celle des coques lactiques. Ainsi, les sous-genres de *Lactobacillus* ont été créés: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* (tab.1). Remarquablement, cette division est toujours valide à un degré considérable, bien que les désignations aient été abandonnées et quelques modifications dans les définitions des sous-groupes ont été faites (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al, 2004).

Ces subdivisions étaient revisitées par Pot et ses collègues en 1994, mais la définition acceptée «moderne» si on peut le dire comme ça, est celle donnée par Hammes et Vogel en 1995 qui divise le genre en 3 sous-genres sur la base du type des sucres fermentés et le processus de fermentation utilisé (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al, 2004).

- ✓ Groupe I : formé des lactobacilles homofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium* ne produisant presque exclusivement que de l'acide lactique a partir de la fermentation des hexoses par glycolyse. Ils ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates.
- ✓ Groupe II : formé de lactobacilles heterofermentaires facultatifs qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium* et qui fermentent les hexoses en acide lactique par glycolyse, et peuvent fermenter les pentoses en acide lactique et en acide acétique grâce a une phosphocetolase inductible.

Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate.

- ✓ Groupe III : formé de lactobacilles heterofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase), et qui fermentent les pentoses en acide lactique et acide acétique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase) (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al, 2004 ; Bakhouche, 2006).

Tableau.1: Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire (Haydersah, 2010).

| | I Homofermentative | II Heterofermentative | |
|--|--|--|--|
| Glucose fermented to lactic acid | ≥ 85% | 50% | |
| Formation of CO ₂ , acetic acid and ethanol | - | + | |
| CO ₂ formed from glucose | - | + | |
| Thiamine required for growth | - | + | |
| Fructose di-phosphate aldolase present | + | - | |
| Orla-Jensen, 1919 | <i>"Thermobacterium"</i> Obligat homofermentative | <i>"Streptobacterium"</i> Facultative Obligat heterofermentative | <i>"Betabacterium"</i> heterofermentative |
| Rogosa, 1970 | IA | IB | II |
| Growth at 45°C | + | d | |
| Growth at 15°C | - | d | |
| Ribose fermented | - | + | + |
| CO ₂ from gluconate | - | + | + |
| Rogosa, 1974 | | II | III |
| Acidophilic | | - | + |
| Ethanol tolerant | | - | + |
| Most carbohydrates fermented | | + | - |
| Sharpe, 1979 | | IIA | IIB |
| Aerobic species | <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. salivarius</i> | <i>L. casei</i> <i>L. coryniformis</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. homohiochii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. yamanshiensis</i> | <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. confusus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. viridescens</i> |
| Anaerobic species | <i>L. ruminis</i> <i>L. vitulinus</i> | | |
| Kandler and Weiss, 1986 | Group I | Group II | Group III |
| Hexose almost exclusively to lactic acid | + | + | - |
| Hexose fermented to lactic-, acetic acid, ethanol, CO ₂ | - | - | + |
| Lactic-, acetic-, formic acid, ethanol under glucose limitation | - | d | + |
| Pentose phosphocetolase | - | + | + |
| Gluconate fermented | - | + | + |

Cette classification est la seule reconnue, bien qu'elle soit imparfaite car le séquençage de l'ADNr 16S (**Fig.2**) a montré que des bactéries lactiques classées selon des caractères phénotypiques sont en réalité de parente phylogénique très éloignée. De plus, le contenu en GC% qui varie énormément d'une espèce à une autre (32 à 53%) et l'absence d'homologie ADN-ADN significative entre beaucoup d'espèces, sont aussi le reflet d'une parente phylogénique éloignée (**Haydersah, 2010**)

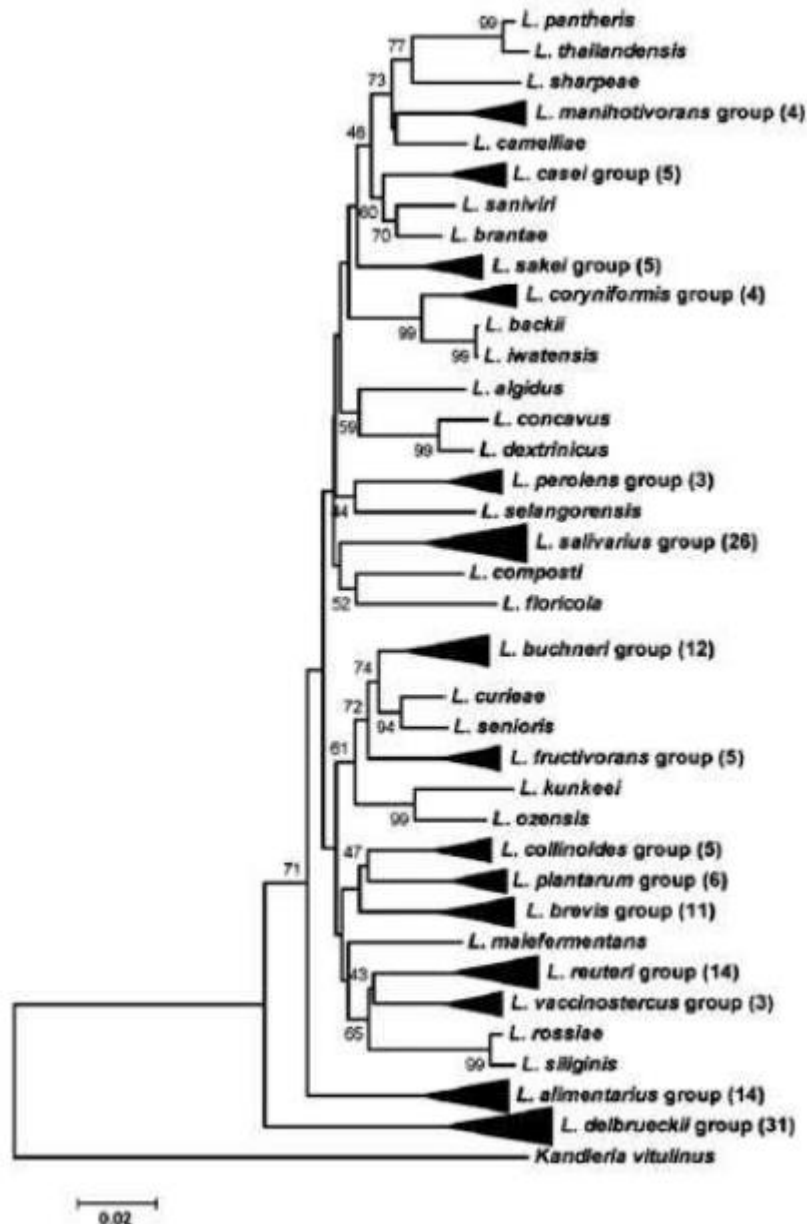


Figure.2 : Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Lactobacillus* basée sur les séquences des gènes ARNr 16S (**Zhang et Cai, 2014**).

5.2. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et *Fructobacillus*:

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide

lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. Les caractéristiques telles que hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al, 1998 ; Ho et al, 2007).

5.2.1. Le genre *Leuconostoc* :

Le terme *Leuconostoc* vient du mot « Nostoc » qui est une algue bleue mucilagineuse et « Leuco » veut dire blanc (Säde, 2011).

La première description du genre *Leuconostoc* a été rapportée par Van Tieghem en 1878 (Zhanget Cai, 2014).

Ces bactéries lactiques sont apparues à l'origine, sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries. Les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent du dextrane en milieu saccharosé (entourées d'une gaine comme celle des Nostocs) (Zarour, 2010).

Au cours des dernières années, plusieurs espèces ont été reclassées à l'intérieur du genre *Leuconostoc* et de nouvelles espèces y ont été ajoutées. En 1984, trois espèces de *Leuc. mesenteroides* (*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*) ont été reclassés en sous-espèces de *Leuc. mesenteroides* (Zhang et Cai, 2014).

Les *Leuconostocs* sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies facultatives avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes (Lahtinem et al, 2012).

Les *Leuconostocs* principalement *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Leuc. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et du CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hadeef, 2012).

Phylogénétiquement, le genre *Leuconostoc* appartient selon la dernière édition du bergey's manuel à :

Régne : Bacteria,

Division : Firmicutes,

Classe : Bacilli,

Ordre : Lactobacillales,

Famille : Leuconostocaceae,

Genre : *Leuconostocs*, *Fructobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella*.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont semblables au Lactobacilles hétérofermentaires, surtout *Lb. confusus* et *Lb. viridescens*. *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont souvent isolés du même habitat et partagent de nombreuses caractéristiques. Hucker et Pederson (1931) ont suggéré que les *Leuconostoc spp.* Sont des formes intermédiaires entre les lactobacilles et les streptocoques (Zhang et Cai, 2014).

Selon Zhang et Cai (2014), le genre *Leuconostoc* comprend actuellement 13 espèces (Tab.2) reconnues et qui sont : *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. citreum*, *Leuc. fallax*, *Leuc. gasicomitatum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. inhae*, *Leuc. kimchii*, *Leuc. lactis*, *Leuc.holzapfelii*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. palmae* et *Leuc. Miyukkimchii* (Zhang et Cai,2014).

Tableau 02 : Liste des espèces du genre *leuconostoc* (Zhang et Cai, 2014).

| Espèces | Année | Origine |
|--|-------|-------------------------------|
| <i>Leuc. Fallax</i> | 1992 | Choukrout |
| <i>Leuc. carnosum</i> | 1989 | Viande stockée à froid |
| <i>Leuc. gelidum</i> | 1989 | Viande stockée à froid |
| <i>Leuc. mesenteroides)</i> <i>Leuc. Mesenteroides ssp. cremoris</i> | 1878 | Inconnu |
| <i>Leuc. mesenteroides ssp. dextransicum</i> | 1929 | Inconnu |
| <i>Leuc. mesenteroides ssp. suionicum</i> | 1912 | Inconnu |
| <i>Leuc. miyukkimchii</i> <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> | 2012 | Inconnu |
| <i>Leuc. citreum</i> | 1967 | Inconnu |
| <i>Leuc. lactis</i> | 1989 | Source humaine |
| <i>Leuc. inhae</i> | 1960 | Inconnu |
| <i>Leuc. kimchii</i> | 2003 | Inconnu |
| <i>Leuc. gasicomitatum</i> | 2000 | kimchi |
| <i>Leuc. holzapfelii</i> | 2001 | kimchi |
| <i>Leuc. Palmae</i> | 2007 | Inconnu |
| | 2009 | Café fermenté Vin de palme |

5.2.2. Le genre *Weissella* :

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont généralement immobiles. Cependant, une nouvelle espèce mobiles avec flagelles péritriches, *Weissella*

beninensis, a récemment été décrite par Padonou et al en 2010. Les espèces du genre *Weissella* sont connues pour produire divers EPS (Lahtinem et al, 2012).

De nos jours, le genre *weissella* comprend dix-huit espèces, qui sont *W. thailandensis*, *W. cibaria*, *W. hellenica*, *W. mineur*, *W. viridescens*, *W. paramesenteroides*, *W. confusa*, *W. soli*, *W. koreensis*, *W. kandleri*, *W. ghanensis*, *W. beninensis*, *W. fabaria*, *W. halotolerans*, *W. oryzae*, *W. diestrammenae*, *W. ceti* et *W. fabalis* (Zhang et Cai, 2014).

La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C (Lahtinem et al, 2012 ; Bjorkroth et Holzapfel, 2006). Les souches *W. beninensis*, *W. cibaria* et *W. thailandensis* peuvent pousser a 10% de NaCl (Zhang et Cai, 2014).

5.2.3. Le genre *Oenococcus* :

Ce sont des bactéries immobiles, asporulées de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles poussant à un pH initial de 4,8. Elles ont pour habitat le vin ; par conséquent, elles tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (Bjorkroth et Holzapfel, 2006 ; Zhang et Cai, 2014).

5.3. Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* :

Ils étaient anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel (Salminen et al, 2004).

5.3.1. Le genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactique», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al, 2005). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable (Fig.3).

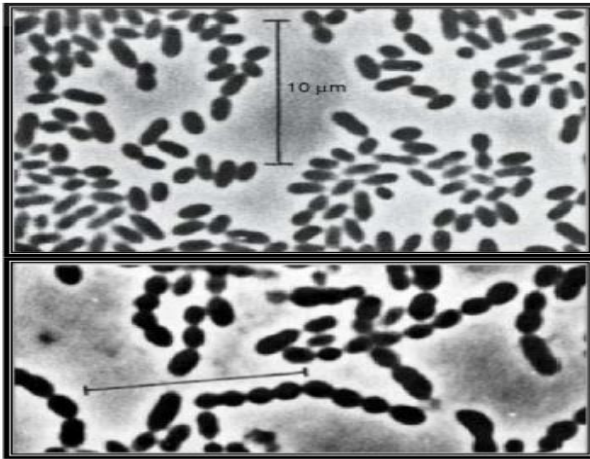


Figure 03 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C ; certaines espèces peuvent pousser à des températures aussi basses que 7°C lors d'une incubation prolongée de 10 à 14 jours. Les cultures se développent typiquement dans 4,0% de NaCl; Toutefois, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ne tolère que 2,0% de NaCl, qui se trouve être la seule exception connue. Les Lactocoques poussent mieux à des valeurs de pH quasi-neutre et cessent de croître à un pH d'environ 4,5 (Tab.4) (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al, 2004 ; Teuber et Geis, 2006 ; Lahtinem et al, 2012 ; Schleifer et al, 2009).

Elles ne poussent pas au pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl. Excepté l'espèce *Lactococcus garvieae*, elles ne sont pas hémolytiques (Alomar, 2007).

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

5.3.2. Le genre *Enterococcus*

Ce groupe des coques Gram-positifs ayant un faible contenu en G+C (<50%), exempts de l'enzyme catalase, et disposés en paires ou en chaînes courtes. Ils sont anaérobies facultatifs, chimio-organotrophes, exempts de quelques cytochromes et pour cela ont un métabolisme exclusivement fermentaire, pendant la croissance, les entérocoques produisent l'acide lactique comme métabolite final (homofermentaires) et de très petites quantités d'acide acétiques, d'acide formique et d'éthanol, mais sans production de gaz. Les entérocoques, jusqu'à une date récente, étaient classés dans le genre *Streptococcus*, dont la création fut proposée par Thiercelin et Jouhaud en 1903 (Klein, 2003).

Andrewes et Horder en 1906, les avaient classés en tant que *Streptococcus faecalis* et ont été considérés comme micro-organismes potentiellement pathogènes, puisqu'ils ont été isolés de patients avec des endocardites (Kaysner, 2003 ; Klein, 2003).

Le nom spécifique «*faecalis*» est dû au fait qu'ils présentaient de nombreuses similitudes avec des souches isolées de l'intestin humain. Des années plus tard, Rebecca

Lancefield (1933) développa un système de typage sérologique qui a permis de séparer divers groupes de streptocoques, dans lequel ceux « d'origine fécale » constituaient le groupe antigénique D, correspondant à la présence de glucose dans les chaînes latérales de l'acide téichoïque de la paroi cellulaire (Achemchem, 2001).

Bien que la classification des entérocoques, en suivant les schémas de la taxonomie classique, serait vague, puisqu'elle ne présente pas de caractéristiques phénotypiques évidentes permettant de les distinguer d'autres coques Gram-positifs exempts de catalase (Devriese *et al.*, 1993), La majorité des espèces sont cependant facilement différenciables par leurs capacités de croître à 10 et à 45°C, en présence de 6,5% de NaCl, à pH 9,6 et en présence de 40% de bile, 0.04% d'Azid sodium ou dans du lait avec 0,1% de bleu de méthylène, en plus de survie au chauffage à 60°C pendant 30 min (Hardie et Whiley, 1997).

Il faut noter cependant que quelques souches de lactocoques, pédiocoques, aérocoques et *Leuconostoc*, sont aussi capables de croître en présence de 6.5% de NaCl, alors que *Ent. cecorum*, *Ent. columbae* et *Ent. avium* en sont incapables. En outre, les pédiocoques et certain souches de lactocoques croissent à 45°C, tandis que la majorité des lactocoques (Achemchem, 2001).

Enterococcus est l'un des genres les plus importants des bactéries lactiques vue sa large distribution environnementale et la grande variété des niches écologiques qu'il occupe depuis les divers aliments fermentés jusqu'au tractus intestinal humain et animal dans lesquels il joue un rôle bénéfique. En étant membres habituels de la microflore intestinale, les entérocoques peuvent servir comme indicateurs de contamination fécale, chose qui est particulièrement importante en Microbiologie de la Santé public et alimentaire. *Ent. faecalis* et *Ent. faecium* ont été soupçonnés d'être des agents causals de maladies transmises par les aliments, néanmoins, ceci n'a jamais pu être confirmé. *E. faecalis* est supposé être le plus important en Microbiologie Clinique comme agent des infections nosocomiales, et tant *Ent. faecalis* que *Ent. faecium* ont développé la résistance à un grand nombre d'antibiotiques glycopeptidiques, la vancomycine et la téicoplanine (Sephard et Gilmore, 2002).

Diverses souches de *Enterococcus* sont employées comme probiotiques et beaucoup d'autres encore sont impliquées dans des fermentations naturelles, comme des olives de table, des produits carnés, et des produits laitiers, en particulier des fromages (Fuller, 1989 ; Franz *et al.*, 2003 ; Giraffa, 2003).

Tableau 03 : caractéristiques physiologiques des espèces appartenant au genre *Enterococcus*.

| Espèce | Croissance à | | Croissance en présence de | | | | Ese. D | Ag. D |
|-------------------------|--------------|------|---------------------------|-----------|----------|-------------|--------|-------|
| | 10°C | 45°C | pH 9.6 | NaCl 6.5% | Bile 40% | Azide 0.04% | | |
| <i>Ent. asini</i> | (+) | (+) | N.D | - | + | N.D | + | + |
| <i>Ent. avium</i> | V | + | + | V | V/+ | N.D | + | + |
| <i>Ent. casseflavus</i> | + | + | + | V/+ | + | + | + | + |
| <i>Ent. cecorum</i> | - | + | (+) | - | (+) | - | + | - |
| <i>Ent. columbae</i> | - | N.D | N.D | - | (+) | - | + | - |
| <i>Ent. dispar</i> | + | - | N.D | +/- | + | - | + | - |

| | | | | | | | | |
|------------------------------|------------|------------|------------|-----|------------|------------|---|------------|
| <i>Ent. durens</i> | + | + | + | + | + | + | + | (+) |
| <i>Ent. faecalis</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. faecium</i> | + | + | + | + | + | + | + | V |
| <i>Ent. flavescens</i> | V/- | V/+ | N.D | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. gallinarum</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. haemoprophysalis</i> | + | - | N.D | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. hirae</i> | + | + | + | + | + | + | + | V |
| <i>Ent. malodoratus</i> | + | - | + | + | + | N.D | + | + |
| <i>Ent. moraviensis</i> | + | - | N.D | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. mundtii</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. porsinus</i> | + | + | N.D | + | N.D | N.D | + | + |
| <i>Ent. pseudoavium</i> | + | + | + | +/- | V/+ | N.D | + | - |
| <i>Ent. raffinosus</i> | (+) | + | + | + | V/+ | N.D | + | N.D |
| <i>Ent. ratti</i> | + | + | N.D | + | N.D | N.D | + | (+) |
| <i>Ent. saccharolyticus</i> | + | + | N.D | (+) | + | N.D | + | - |
| <i>Ent. solitarius</i> | + | + | N.D | + | + | N.D | + | + |
| <i>Ent. sulfureus</i> | + | - | N.D | + | + | N.D | + | - |
| <i>Ent. villorum</i> | N.D | N.D | N.D | + | + | + | + | N.D |

N.D : non déterminé (+) : habituellement positif ; **V** : variable ; +/- ; **Ese** : hydrolyse de l'esculine ; **Ag. D** : antigène D.

5.3.3. Le genre *Streptococcus* :

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *S. salivarius*, *S. bovis*) et les autres streptocoques (**Scheilfer, 1987**).

La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (**Stiles et Holzappel, 1997**).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Haddie, 1986 ; Pilet et al, 2005**).

S. thermophilus est la seule espèce non pathogène du genre *Streptococcus*, appartenant au groupe des bactéries ayant un intérêt industriel et nutritionnel reconnu sous le nom GRAS (**Dellaglio et al, 1994 ; Hols et al, 2005**).

Des études moléculaires portant sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont démontré que *S. thermophilus* est une espèce très distincte des *S. salivarius* et des entérocoques (**Delorme, 2008**).

S. thermophilus appartient au groupe des « streptocoques viridans ». Ce groupe est subdivisé en cinq sous-groupes qui sont :

- le groupe des *mutans* ;
- le groupe des *anginosus* ;
- le groupe des *sanguinis* ;
- le groupe des *mitis* et
- le groupe des *salivarius* (Facklam, 2002).

Toutes les espèces du groupe « streptocoques viridans » sont commensales, elles sont trouvées dans les cavités buccales, gastro-intestinales et dans les tractus génitaux des mammifères (Facklam, 2002), à l'exception de *S. thermophilus*. Cette espèce appartient au groupe des *salivarius*. Ce groupe comprend à son tour trois espèces, *S. salivarius*, *S. vestibularis* et *S. thermophilus*.

Cette espèce diffère des autres coques lactiques homofermentaires par des caractères majeurs, telle que son incapacité à fermenter le maltose et à hydrolyser l'esculine (Tab.4).

Tableau 04 : Caractéristiques des genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* d'après (Guiraud, 1998).

| | <i>Enterococcus</i> | | | <i>Lactococcus</i> | | | <i>Streptococcus</i> | | | | | |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|--------------------|------------------------|
| | <i>Ec. durans</i> | <i>Ec. faecalis</i> | <i>Ec. faecium</i> | <i>Lc. lactis ssp cremoris</i> | <i>Lc. lactis ssp lactis</i> | <i>Lc. « dilaceiflactis »</i> | <i>S. agalactiae</i> | <i>S. bovis</i> | <i>S. dysgalactiae</i> | <i>S. mitis</i> | <i>S. pyogenes</i> | <i>S. thermophilus</i> |
| Groupe sérologique | D | D | D | N | N | N | B | D | C | A | A | A |
| Hémolyse | αβ | β | (α) | γ | γ | γ | (β) | (α) | β | (α) | β | (α) |
| Croissance à 10°C | V | + | + | + | + | + | V | - | - | + | - | - |
| Croissance à 45°C | + | + | + | - | - | - | - | V | - | V | - | + |
| Croissance à pH 9.6 | + | + | + | + | - | + | - | V | - | V | - | - |
| Croissance à 6% Na Cl | + | + | + | - | - | - | V | - | - | - | - | - |
| Croissance sur milieu bilie | + | + | + | - | - | - | V | + | - | V | - | - |
| Résistance 30min 60°C | V | + | + | V | V | V | - | + | - | - | - | + |
| Résistance à l'optochine | - | - | - | - | - | - | + | + | + | V | + | V |
| Croissance sur lait | V | + | + | + | V | - | - | - | - | - | - | - |
| Arginine | + | + | + | + | - | + | + | - | + | V | + | V |
| Résistance au tellurite | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hydrolyse de l'hippurate | V | V | + | - | V | V | + | - | - | - | - | - |
| Réduction du TTC | - | - | - | - | - | - | - | V | - | - | - | - |
| Lait tournesolé | ARC | ARC | ARC | ARC | ARC | ARC | - | AC | - | - | A | AC |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | V | + | + | + | + | + |
| Maltose | (+) | (+) | (+) | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| Acétoïne (VP) | V | V | V | + | - | - | V | V | - | - | - | V* |
| B-glucuronidase | - | - | - | - | - | - | (+) | + | + | - | (-) | - |
| Célastinase | - | V | - | - | - | - | - | - | - | - | V | - |
| Esculine | + | + | + | V | V | V | - | + | - | V | V | - |

V: Variable; (+) positive pour la plupart des Souches ; A : Acidification ; R : Réduction ; C : Coagulation ; (.) : Non signalé; * : + sur citrate ; - : négative

6. Utilisation et application

Les bactéries lactiques ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et par là d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des altérations organoleptiques. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (MAYRA-MAKINEM et BIGRET, 1998).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (RUAS-MADIEDO et al., 2002 ; WISSELINK et al., 2002).

Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (RODRIGUEZ et al., 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (LANGELLA et al., 2001).

La fermentation améliore la conservation et modifie la saveur des aliments. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain (Tableau 5) (LANGELLA et al., 2001).

Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al., 20018). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et al., 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et al., 2011).

Uehara et al.,(2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie

Taleau 05 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (SPINNLER,1995)

| Famille | Genre | Substrat | Exemples |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|---|
| <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Lactobacillus</i> | Lait | laits fermentés, yaourts, kéfirs, la plupart des fromages |
| | | Viande | saucissons secs, jambons secs |
| | | poissons | nuoc mam |
| | | végétaux | choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja |
| | | céréales | pain au levain, bières, huangjiu |
| | <i>Pediococcus</i> | végétaux | choucroute, ensilage |
| | | Viande | saucisses semi-séchées, saucissons secs |
| | | poissons | nuoc mam |
| | | céréales | pain au levain, riz fermenté |
| | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Lactococcus</i> | Lait |
| <i>Streptococcus</i> | | Lait | yaourts, laits fermentés, fromages à pâte pressée cuite |
| <i>Enterococcaceae</i> | <i>Tetragenococcus</i> | végétaux | sauce de soja, miso |
| | | poissons | saumure d'anchois, sauce de poisson, nuoc mam |
| <i>Leuconostocaceae</i> | <i>Leuconostoc</i> | végétaux | choucroute, olives, vin, cidre |
| | | Lait | fromages, kéfirs |
| | <i>Oenococcus</i> | végétaux | Vin |
| <i>Bifidobacteriaceae</i> | <i>Bifidobacterium</i> | Lait | laits fermentés |

7. Fermentation lactique

Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration, elles recourent à la fermentation des glucides en acide lactiques, Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), (**fig-4**)
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), (**fig-4**)
- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (**fig-4**) (VANDAMME et al., 1996).

7.1. Voie homofermentaire

Utilise la glycolyse dans sa totalité, du glucose au pyruvate puis lactate. En condition optimale de croissance, cette voie produit deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Pour être qualifiée d'homolactique, cette voie doit convertir au moins 90 % du glucose consommé en lactate. Mais dans des conditions de croissance non optimales (milieu appauvri, sur certains sucres, avec des souches mutées...) (VANDAMME et al., 1996).

7.2. Voie hétérofermentaire

Produit outre l'acide lactique, des quantités significatives de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. La dégradation d'une molécule de glucose conduit à la formation d'une molécule de lactate, une molécule d'éthanol (CH₃CH₂OH), d'un CO₂ et d'un ATP (VANDAMME et al., 1996).

7.3. Voie fermentaire bifide

(ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase FPC) est la voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (VANDAMME et al., 1996). Les voies fermentaires des bactéries lactiques sont résumés dans la (figure 4) :

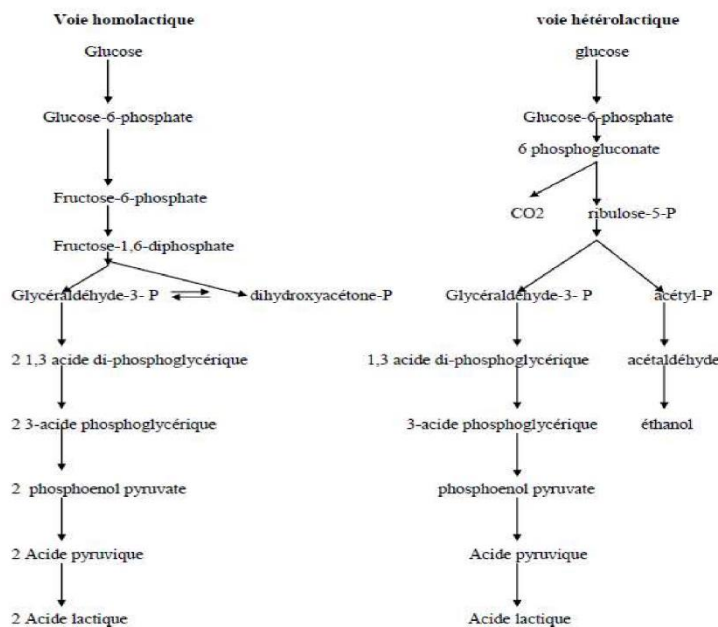


Figure 04 : Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De ROISSART et LUQUET, 1994).

8. Interaction avec d'autres micro-organismes :

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutérine et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Messens et De Vuyst, 2002).

Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

8.1. Activité antifongique :

8.2. Les lactobacilles et l'inhibition fongique :

La description de *Lactobacillus* a été démontrée par Beijerinck en 1901. Les lactobacilles peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes, homofermentaires ou hétérofermentaires et ubiquistes. La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Tailliez, 2004). Le genre *Lactobacillus* est le plus retrouvé parmi les bactéries lactiques à caractère antifongique, suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* ainsi que des genres *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins retrouvés (Shekh *et al.*, 2009 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Dalié *et al.*, 2010a ; Nakata *et al.*, 2010 ; Ndagano *et al.*, 2011 ; Baek *et al.*, 2012).

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

8.3. Les substances antifongiques :

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

Outre que les métabolites antifongiques, la compétition nutritionnelle a été prouvée aussi comme un obstacle antifongique (Bayrock et Ingledew, 2004).

8.4. Les acides organiques :

Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits pas les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaire. Leurs effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (**Davison, 1997 ; Tou et al., 2006 ; Djè et al., 2008**). Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomi et al., 2000 ; Mensah et al., 1991 ; Annan-Prah et Agyeman, 1997**). L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (**Blom et Mortvedt, 1991**).

8.5. Peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du **peroxyde d'hydrogène** (H₂O₂) en eau et en oxygène. En conséquence, l'H₂O₂ produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (**Condon, 1987**).

L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

8.6. Dioxyde de carbone :

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du **dioxyde de carbone** (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

8.7. Le diacétyl :

Le diacétyl est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif. Le diacétyl inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine (**Motlagh et al., 1991**). Toutefois, le diacétyl est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

8.8. Les bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle proposée par Klaenhammer (1988) qui considère les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009), ou bien sont des peptides antimicrobiens, dont l'activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par un ou plusieurs protéines d'immunité (Drider et Prevost, 2009).

Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par les bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire (Jack *et al.*, 1995 ; Jasniwski, 2008).

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

- **Classe I : Les lantibiotiques** : Le nom lantibiotique est une abréviation pour désigner un peptide antibiotique qui contient une lanthionine, de poids moléculaire inférieur à 5 kDa.
 - ✓ **Type A** : Comprend les peptides linéaires flexibles, comme la nisine.
 - ✓ **Type B** : Comprend les peptides globulaires, qui sont soit non chargés ou chargés négativement.
- **Classe II** : Les protéines de faibles poids moléculaire (<10 kDa) et stables à la chaleur.
 - ✓ **Classe IIa** : «Pediocin-like bacteriocins», ce nom fait référence à la première bactériocine découverte dans cette classe.
 - ✓ **Classe IIb** : «Two-peptide bacteriocins» La lactococcine G (Len- α) et (Len- β) fut la première bactériocine de cette classe.
 - ✓ **Classe IIc** : Sont des bactériocines cycliques dont les extrémités N-terminale et C-terminale sont liées de manière covalente.
 - ✓ **Classe IId** : Sont des peptides linéaires non cycliques.
- **Classe III** : Sont des protéines de hauts poids moléculaire et sensibles à la chaleur, dont la masse moléculaire est supérieure à 30 kDa.
- **Classe IV** : Sont des protéines complexes dont l'activité requiert l'association de carbohydrates ou de moitiés lipidiques (Nissen-Meyer *et al.*, 2009 ; Nissen-Meyer *et al.*, 2010 ; Stoyanova *et al.*, 2012).

8.8.1. Bactériocines produites par des bactéries du genre *Enterococcus* :

L'entéroccine L50, produite par *En. faecium* L50, est une bactériocine composée de deux peptides, l'entéroccine L50A (EntL50A) et l'entéroccine L50B

(EntL50B) partageant 72 % de similarité de séquence (Cintas *et al.*, 1998). L'EntL50A et l'EntL50B sont co-transcrites à partir de deux gènes présents sur le plasmide pCIZ1 (Cintas *et al.*, 1998). Chacun de ces deux peptides présente une forte activité antimicrobienne seul ou en association (Cintas *et al.*, 1998). Sans ce n'étant l'absence du peptide leader, l'action synergique des deux peptides EntL50A et EntL50B pourrait permettre de placer l'entéroïne L50 dans la classe IIb. L'entéroïne L50 est également produite par d'autres souches d'*Enterococcus* telles qu'*En. faecium* 6T1a et *En. faecium* MRR10-3. Elles sont respectivement appelées entéroïne I/ J (Floriano *et al.*, 1998, Ruiz-Barba *et al.*, 2007) et entéroïne MR10R/ MR10B (Martin-Platero *et al.*, 2006). Une autre bactériocine, l'entéroïne RJ-11, est un peptide unique produit par *En. faecalis* RJ-11, similaire à l'EntL50A. Contrairement aux entéroïnes Ent50A et Ent50B, l'entéroïne RJ-11 agirait probablement seule (Yamamoto *et al.*, 2003). En plus de porter les gènes codant la bactériocine L50, le plasmide pCIZ2 renferme un gène codant une autre bactériocine de classe IId, l'entéroïne Q (Cintas *et al.*, 2000). Les gènes codant les précurseurs des deux bactériocines sont généralement co-exprimés (Cintas *et al.*, 2000, Criado *et al.*, 2006).

8.8.2. Bactériocines produites par des bactéries du genre *Lactobacillus* :

D'autres bactériocines de la classe IId sont produites par des bactéries du genre *Lactobacillus* parmi lesquelles la lacticine Q (Fujita *et al.*, 2007) et la lacticine Z (Iwatani *et al.*, 2007) produites respectivement par *Lb. lactis* QU 5 et *Lb. lactis* QU14. Ces deux peptides présentent une homologie de séquence et leur méthionine N-terminale serait formylée. Par ailleurs, les lacticine Q et Z sont actives avec des CMI de l'ordre du nanomolaire contre des bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Fujita *et al.*, 2007, Iwatani *et al.*, 2007). De plus, la séquence de la région N-terminale des lacticines Q et Z est proche de celle de l'auréocine A53.

9. Propriétés probiotiques :

Fuller(1998) définit les probiotiques comme étant des « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». **Guarner et Schhfsma (1998)** proposent de modifier cette définition en incluant tous les « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en un certain nombre, exercent des effets bénéfiques dans le tractus intestinal suffit à conférer un effet positif sur l'hôte. Le sujet doit toutefois ingérer 10⁹ UFC par jour pour qu'un effet probiotique soit observé (**Ouwehanf *et al.*, 2002**)

grenade présentent une activité antifongique dont 82 % sont des coques (Gajbhiye *et al.*, 2012).

10. Méthodes de conservation

10.1. Méthodes de conservation des souches lactiques

Les ferments lactiques utilisés dans le domaine agro-alimentaire, sont généralement fournis aux utilisateurs sous trois formes physiques : liquide, congelée ou lyophilisée (TAMIME et ROBINSON, 1999).

Pour des raisons de facilité de conservation, de transport et d'utilisation, la forme liquide a été largement supplantée par les formes congelées et lyophilisées. Ces dernières réduisent en effet le nombre de cultures intermédiaires en usine. Les ferments liquides restent, cependant, encore utilisés par certaines fromageries (BEAL *et al.*, 2008).

La lyophilisation est une technique de stabilisation qui permet le stockage des bactéries à 4 °C ou -18 °C. L'intérêt de la lyophilisation des ferments lactiques est lié au fait que, grâce à la réduction de volume par rapport aux bactéries congelées, les coûts de stockage et de transport sont faibles. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours et sont plus facilement manipulables. Cependant, la lyophilisation implique des étapes et des équipements supplémentaires par rapport à la congélation, ce qui la rend plus coûteuse. De plus, cette technique n'est pas applicable à tous les ferments, en raison de l'importante sensibilité de certaines bactéries à la déshydratation. (TAMIME et ROBINSON, 1999).

10.1.1. Congélation :

La congélation est actuellement la technique de conservation des bactéries lactiques la plus utilisée dans le domaine agro-alimentaire. Une bonne maîtrise de cette opération est nécessaire pour éviter ou minimiser les pertes de viabilité liées à l'abaissement de la température et à la formation de glace au cours de la congélation. Par rapport à la lyophilisation, elle permet une reprise d'activité plus rapide des ferments et présente un coût de fabrication inférieur à celui des ferments lyophilisés. Cependant, elle induit aussi des pertes de viabilité, inégalement maîtrisées jusqu'à présent. De plus, les ferments congelés nécessitent une attention spéciale par rapport au maintien de la chaîne du froid lors de leur transport et leur stockage. Il est aussi préconisé que les bactéries congelées soient stockées à des températures inférieures à -45 °C, afin d'assurer la stabilité de la qualité et de l'activité des ferments (STREIT, 2008). Cependant la congélation à une température de -20°C permet une conservation de la plus part des microorganismes pendant 1 à 2 ans et le métabolisme de ces derniers en dessous de -18°C est totalement inhibé (LARPENT, 1997).

10.1.2. Lyophilisation :

La technique consiste à éliminer l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux (De BEER *et al.*, 2006). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte

le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur, ou piège. Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur (CHOUVENC *et al.*, 2004). La lyophilisation comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire.

10.1.2.1. Lyophilisation des bactéries lactiques :

La lyophilisation est développée pendant la seconde guerre mondiale pour le stockage du plasma sanguin (PEGG, 2002). Ainsi, pour des vaccins comme pour un grand nombre de médicaments et de micro-organismes. Cette technique de conservation est la seule technique permettant une conservation à long terme des principes actifs à l'état sec (TANG et PIKAL, 2004). Dans le domaine des industries alimentaires, les ferments lactiques (probiotiques et starters) sont de plus en plus utilisés sous la forme lyophilisée (PEGG, 2002). en générale l'opération de lyophilisation consiste à :

- ✓ Congeler les aliments pour que l'eau qu'ils contiennent soit sous forme de glace;
- ✓ Ensuite sous l'effet du vide, sublimer la glace directement en vapeur d'eau;
- ✓ Récupérer cette vapeur d'eau;
- ✓ Une fois que toute la glace est sublimée, les aliments sont séchés à froid et on peut les retirer de l'appareil.

11. Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont un besoin particulier pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, vu leur faible biosynthèse, elles sont donc auxotrophes. Elles sont par conséquent considérées comme le groupe de bactéries le plus exigeant de point de vue nutritionnel (**Dridier et Prevost, 2009**).

11.1. Exigences en acides aminés :

Les bactéries lactiques sont en principes incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (**Luquet, 1986**). Les exigences en acides aminés des *Streptococcus* sont différentes de celles des *Lactobacillus*, ils ont besoin d'acide glutamique d'histidine, de cystéine, de méthionine et aussi de valine, de leucine et de tryptophane ou de tyrosine. Les lactobacilles ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (**Lenoir et al., 1992**).

11.2. Exigences en bases azotées :

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1983).

11.3. Exigences en sels minéraux :

Les besoins en éléments minéraux des bactéries lactiques ne sont encore partiellement connus. Les principaux éléments tel que le magnésium et le manganèse sont généralement requis (Imbert et Blandeau, 1998; Letrot et Juillard, 2001; Corrieu et al., 2008) jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (Ledesma et al., 1977; Mazali, 1992), alors que les besoins en calcium et en potassium sont moins systématiques. Les besoins en fer dépendant des micro-organismes (Pandey et al., 1994; Impert et Blandeau, 1998).

Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à fort concentration. A l'opposé, le sodium, le cadmium, et le cuivre démontrent un effet inhibiteur (Corrieu et al., 2008).

11.4. Exigences en cations :

Le rôle principal des cations dans la nutrition des bactéries lactiques et dans les différentes réactions métaboliques (Boyaval et al., 1988). La forme ionique entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres, par exemple Amouzou et al., (1985) ont montrés le rôle du Mg^{2+} sur *Streptococcus thermophilus*.

11.5. Exigences en vitamines :

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable des coenzymes dans le métabolisme cellulaire. *Streptococcus thermophilus* à une exigence absolue en acide pantothénique (B5), en riboflavine (B2), à moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8).

La pyridoxine et ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance (Desmazeaud, 1983).

11.6. Exigences en glucides :

Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter des glucides. (Wood et Holzappel, 1995; Bazo, 2011), par exemple *S. thermophilus* est fermenté et transformé rapidement du lactose en lactate, et utilise différentes sources tel que : lactose, saccharose, glucose, galactose, fructose. *S. thermophilus* a été adapté à s'alimenter et croître en présence de lactose comme source de carbone (Vaillancourt et al., 2002 ; Vanden Bogaard et al., 2004 ; Ben-Yahia, 2012).

CHAPITRE II

ALTERNARIA ALTERNATA

1. Généralités sur les *Alternaria* :

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (Logrieco *et al.*, 2009). Autant que parasites de faiblesse, les *Alternaria* sont capables de mener une existence saprophytique pendant des périodes plus ou moins longues. Certains, tels qu'*A. chartarum*, *A. consortiale*, *A. tenuis*, etc., ont un habitat le plus souvent saprophytique et se rencontrent couramment sur des débris organiques ou les végétaux morts. Quelques espèces, comme *A. solani*, *A. dauciet* ses formes, *A. linicola*, *A. zinniae*, etc., vivent au contraire à l'état de parasites sur des plantes encore apparemment vigoureuses (Messiaen *et al.*, 1991). Ce sont des champignons mésophiles, leurs activités prédominantes disparaissent lorsque la température s'élève (Botton *et al.*, 1990).

Le stockage des graines contaminées peut favoriser l'accumulation de toxines surtout étudiées pour l'espèce *A. alternata*. Les *Alternaria* sont donc des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sols, textiles, graines (Linan *et al.*, 1999). L'air joue un rôle important dans la dispersion des spores. Les spores d'*Alternaria* sont des allergènes. Les spores sont également infectieuses déterminant le plus souvent des formes cliniques cutanéopidermiques favorisées par certains facteurs : diabète mal équilibré, corticothérapie (Badillet, 1991). Les spores fongiques produisent aussi des protéines allergènes qui peuvent causer des maladies immunotoxiques, tels que l'asthme (D'Amato et Spiekma, 1995 ; Dutkiewicz, 1997 ; Bush et Portnoy, 2001). Les chercheurs rapportent un nombre croissant de patients présentant une allergie respiratoire, en particulier les enfants (Emery *et al.*, 2004).

2. Historique de la taxonomie d'*Alternaria* :

Le genre *Alternaria* a été initialement décrit en 1816 avec *A. tenuis*, comme le type et le seul membre du genre (Nees, 1816). Parmi les caractéristiques du genre, la production de chaînes de conidies multicellulaires de couleur foncée avec des cloisons longitudinales et transversales (phaeodictyospores), et d'un bec filamenteux avec des cellules apicales. Depuis sa création, le statut taxonomique du genre a été en mouvement. Dans son œuvre monumentale «Systema Mycologicum», Fries (1832), ne reconnaît pas la description d'*A. tenuis*. Nees a cité cette espèce comme un synonyme de *Torula alternata*. En outre, Fries a érigé un nouveau genre, *Macrosporium*, qui comprend plusieurs espèces qui partagent des caractères phaeodictyosporique avec *Alternaria* et sont actuellement reconnus comme des espèces d'*Alternaria*, notamment *tenuissima*. Il a ensuite identifié les champignons phaeodictyosporique qui ont été attribués à deux : *Alternaria* et *Macrosporium* et aucun consensus clair ne s'est révélé de plus de 100 ans. Pendant une bonne partie de cette période, de nombreuses espèces *Alternaria* «atypiques» ont été décrites, *Macrosporium* qui ne produisent pas de conidies en chaînes et /ou ont une conidie avec bec. En outre, deux autres genres ont été érigés, *Stemphylium* et *Ulocladium*, qui ont été également caractérisés par la production de phaeodictyospores, ce qui complique la résolution taxonomique de ce groupe de champignons. La confusion croissante sur le statut taxonomique de ces champignons a incité plusieurs re-descriptions de ces genres afin d'accueillir un nombre croissant de nouvelles espèces (Saccardo, 1886 ; Elliot, 1917). En raison de l'ambiguïté, Néedans « description de l'espèce d'origine pour *A. tenuis* », et celle de Fries « placement erronées générique de *T. alternata* », Keissler (1912) a mis le synonyme à la fois *A. tenuis* et *T. alternata* avec « *Alternaria*

alternata Kiessl. » un nouveau nom. Wiltshire (1933, 1938) a en outre proposé des critères révisés pour les genres *Alternaria* ainsi que le genre *Stemphylium*. *Ulocladium* n'a pas été officiellement reconnu, *Macrosporium* a été placé sur la liste des nominations *ambigua*, et beaucoup d'espèces «atypiques» ont été placés dans un sous-genre de *Stemphylium*, *Pseudostemphylium*. Joly (1964) a examiné le genre *Alternaria* et des espèces apparentées, et a proposé que la plupart de ces espèces «atypiques» classées comme *Alternaria* plutôt que *Pseudostemphylium*. Enfin, les concepts modernes de ces genres issues des travaux de Simmons (1967) dans son essai « typification de *Alternaria*, *Stemphylium*, et *Ulocladium* ». Simmons a examiné *Alternaria*, *Stemphylium*, et le genre longtemps négligé *Ulocladium*, et a conclu que la plupart des espèces «atypiques» d'*Alternaria* et de *Stemphylium* doivent être classés comme *Ulocladium*.

3. Classification et biologie des *Alternaria* :

Les membres du genre *Alternaria* possèdent des conidies septées avec cloisons transversales et longitudinales, les cellules sont multi nucléées (pluricellulaires) de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espèces (Rotem, 1994). Elles possèdent un pigment de type mélanine qui leur servent de protection contre des conditions environnementales défavorables, y compris la résistance aux microbes et enzymes hydrolytiques (Rotem, 1994). Les champignons du genre *Alternaria* sont des *Deuteromycètes* (syn. *Adélomycètes*, *fungi imperfecti*). Cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est généralement inconnue mais possèdent un mode de multiplication asexuée, par conidies. Certaines espèces d'*Alternaria* ont une reproduction sexuée et leur forme parfaite appartient aux *Loculoascomycètes* (genre *Pleospora* ou *Lewia*) (Ellis, 1971 ; Simmons, 1986 ; Erikson et Hawksworth, 1991). Tous les téléomorphes connus des taxons d'*Alternaria* sont membres du genre d'*Ascomycète* *Lewia* Barr et Simmons. *Lewia* est une ségrégation d'un groupe hétérogène d'espèces à ascome « ou ascocarpe » relativement restreint historiquement accumulée dans *Pleospora* Rabh. (*sensu* Wehmeyer, 1961). La relation des taxons d'*Alternaria* du groupe d'espèces *A. infectoria* avec ceux des espèces *Lewia* est maintenant mieux établie à travers les nombreuses études sur les ascospores-a-conidies et les conidies-à-ascome en cultures axéniques (Simmons, 2007). Les *Alternaria* sont classés dans l'ordre des *hyphales* (Syn. *Moniliales*), ayant des conidiophores peu différenciés, libres, disséminés sur le substrat et à croissance sympodiale et des conidies qui se forment hors d'un concept spécial (Figure 5). La coloration foncée de leur mycélium et de leurs conidies les classent dans la famille des *Dematiaceae* (Agrios, 2005).

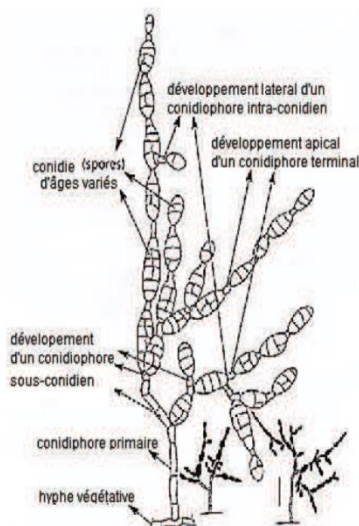


Figure 5: Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d'*Alternaria alternata* (Simmons, 1999 ; Taralova *et al.*, 2011).

4. La plante hôte :

a. Les *Solanacées* :

Exceptionnellement diversifiée, la famille des *Solanacées* comprend entre 3000 et 4000 espèces, réparties à travers le monde en 90 genres aux morphologies variées : arbres, arbustes, lianes, herbes vivaces ou annuelles. La plupart des espèces poussent dans les régions tropicales, plus particulièrement en Amérique du sud. La famille des *Solanacées* revêt une grande importance économique. En effet, elle renferme beaucoup de plantes ornementales (petunia, datura, physalis...), industrielles (tabac), et surtout bon nombre de fruits et légumes (tomates, piments, poivrons, aubergine, pomme de terre...). A celles-ci s'ajoutent des plantes médicinales comme la belladone, la jusquiame, la morelle ou la stramoine.

b. La Tomate :

Originnaire de l'Amérique du Sud, dans la région montagneuse des Andes (Equateur, Pérou, Chili), la tomate fut domestiquée au Mexique, avant d'être importée en Europe au XVI^e siècle par les conquistadores (Peralta *et al.*, 2006). Elle est l'ingrédient de cuisine le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. C'est une plante herbacée vivace mais cultivée comme annuelle, aux tiges ramifiées et port rampant. La tige est pubescente, épaisse aux entre-nœuds. Les feuilles sont composées (5 à 7 folioles), alternées et persistantes. Les fruits sont des baies formées de 2 à 3 loges, à graines très nombreuses, et dont la taille, la forme et la couleur varient avec les différentes variétés. Elle a une température optimale de croissance de l'ordre de 25°C et un thermo-périodisme journalier de 10°C, conditions qu'elle a retenues de son origine montagnarde (Messiaen *et al.*, 1991). L'espèce cultivée de la tomate est communément connue sous le nom de *Lycopersicon esculentum* Mill. La classification de la tomate fut l'objet de nombreuses controverses pendant plusieurs décennies. En effet, se basant uniquement sur des critères morphologiques, taxonomistes et botanistes proposèrent différents noms : *Lycopersicon esculentum* Mill *Solanum lycopersicum* L et *Lycopersicon lycopersicum*. (L.) Karsten (Peralta *et al.*, 2006).

c. La pomme de terre :

La pomme de terre, est un tubercule comestible produit par l'espèce *Solanum tuberosum*, appartenant à la famille des *Solanacées*. Le terme désigne également la plante elle-même, plante herbacée, vivace par ses tubercules en l'absence de gel mais cultivée comme une plante annuelle. La pomme de terre est une plante qui réussit dans la plupart des sols, mais elle préfère les sols légers légèrement acides. La plante est sujette aux maladies dans des sols calcaires ou manquant d'humus. La pomme de terre est originaire de la cordillère des Andes dans le sud-ouest de l'Amérique du Sud ou son utilisation remonte à environ 8 000 ans. Introduite en Europe vers la fin du XVI^e siècle à la suite de la découverte de l'Amérique par les conquistadors espagnols, elle s'est rapidement diffusée dans le monde et est aujourd'hui cultivée dans plus de 150 pays sous pratiquement toutes les latitudes habitées. La pomme de terre appartient au genre *Solanum* et plus précisément au sous-genre *Potatoe*, section *Petota* sous-section *Potatoe*. Cette sous-section se distingue par la présence de tubercules véritables qui se forment à l'extrémité des stolons (Hawkes, 1994). Elle regroupe les espèces de pommes de terre cultivées et les espèces sauvages apparentées (Carlos *et al.*, 1991). La série *Tuberosa*, à son tour, se caractérise par ses feuilles imparipennées ou simples, sa corolle ronde ou pentagonale et ses baies arrondies (Hawkes, 1990). L'espèce *Solanum tuberosum* se différencie des autres espèces de la même série taxonomique par l'articulation du pédoncule en son tiers médian, les lobes du calice courts et disposés régulièrement, les feuilles fréquemment arquées, les folioles toujours ovales à

lancéolées, approximativement deux fois plus longues que larges et les tubercules ayant une période de dormance bien marquée.

5. Les *Alternaria* pathogènes des *Solanacées* :

Alternaria solani est signalé depuis plusieurs décennies comme pathogène des *Solanacées* et a longtemps été décrit comme affectant la tomate, l'aubergine, la pomme de terre, ainsi que plusieurs membres de cette famille botanique (Blancard *et al.*, 2012). Depuis la première description par Ellis et Martin en 1882 (cité dans Sherf et MacNab, 1986), *A. solani*, précédemment connu sous le nom d'*A. porrif. sp. solani* (Neergaard, 1945) qui a fait l'objet de nombreuses études (Strandberg, 1992 ; Rotem, 1994). Un champignon ascomycète, *Pleosporasolani*, a été revendiqué par Esquivel (1984) comme le stade teleomorphe d'*A. solani*, mais cela n'a pas été confirmé par d'autres. En fait, la situation des *Alternaria spp.* sur ces plantes est beaucoup plus complexe. Ainsi, plusieurs espèces d'*Alternaria* seraient inféodées à plus d'une soixantaine de *Solanacées*. De plus, il apparaît que sur la tomate sévirait plutôt une autre espèce, morphologiquement assez comparable à *A. solani*, dénommée « *Alternaria tomatophila* ». En effet, deux phénotypes existeraient au sein de cette espèce, différenciables par l'aspect de leurs colonies en boîtes de Pétri : un phénotype clair, plus agressif sur tomate, et un autre foncé (Frazer, 2002).

Alternaria solani serait l'agent pathogène de l'alternariose de la pomme de terre, et *A. beringelae* E.G. Simmons (2000) sévirait sur aubergine. Il est à noter qu'*A. subcylindrica* E.G. Simmons & R.G. Roberts (2000) a été ponctuellement observé sur feuilles de tomate cerise tout comme *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal. (2000) identifié en Grèce sur des lésions foliaires classiques d'alternariose. Il a été signalé aussi qu'*A. subtropica* E.G. Simmons (2000) peut occasionner des taches sur fruits.

D'autres *Alternaria* s'attaquent aussi à la tomate comme *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, *A. alternata* et *A. tomato* (Cooke) Jones.

5.1. Symptomatologie

Les symptômes de la brûlure foliaire provoqués par les *Alternaria* pathogènes à grosses et à petites spores sont souvent très similaires, plusieurs de ces espèces peuvent être présentes sur le même hôte dans des conditions favorables à leur développement.

5.2. Sur feuilles

Les attaques débutent à partir des feuilles basses, âgées et déjà séniles. Il est rare de les voir s'installer directement sur un organe sain, leur implantation exige un affaiblissement physiologique; une simple blessure sur un organe vigoureux est souvent suffisante pour permettre l'infection directe (Messiaen *et al.*, 1991). Les premiers symptômes de la maladie dans les champs sont précoces et se traduisent par l'apparition de petites lésions ovales et circulaires noires de 1 mm de diamètre sur les tiges et les feuilles. Par la suite, elles s'étendent progressivement et s'auréolent d'un halo jaune souvent bien marqué. Atteignant plusieurs millimètres, elles révèlent souvent de discrets anneaux concentriques d'un brun plus foncé (Blancard *et al.*, 2012). Les lésions deviennent parfois irrégulières car elles se développent et fusionnent entre elles. Dans des conditions favorables, les infections graves peuvent éventuellement entraîner la mort des feuilles voir la plante. Les lésions sont d'abord superficielles et deviennent déprimées au fur et à mesure qu'elles se développent. Les feuilles atteintes jaunissent et au final toute la surface du limbe se dessèche. En plus des taches foliaires.

Une chlorose suivie de la mort des feuilles est observée quand une lésion de la tige se trouve à l'aisselle de la feuille (Lopes *et al.*, 1994). (Figure 06).

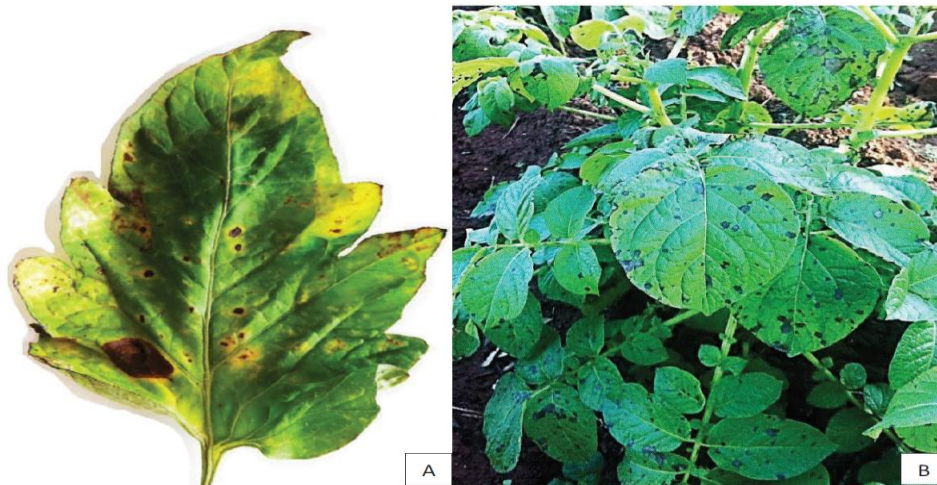


Figure 6 : Symptômes de l'alternariose: **A.** taches sur foliole de tomate provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata* (*sensu lato*); **B.** taches sur feuilles de pomme de terre provoquées par *A. solaniet A. alternata* (*sensu lato*).

5.3. Sur tiges et collets :

Le pathogène peut aussi provoquer de graves lésions sur tiges qui peuvent atteindre jusqu'à 5 cm de longueur. Quand des conditions météorologiques sont favorables, les lésions se développent sur les tiges et les pétioles (Grogan *et al.*, 1975 ; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000 ; Verma et Verma, 2010). Le dépérissement des extrémités du collet est un autre symptôme associé à la maladie (Patterson, 1991) (**figure 7 B**), les lésions ne parviennent pas à ceinturer les tiges en particulier avec les variétés qui ont des tiges plus épaisses (Lopes *et al.*, 1994). Ce symptôme est rare en temps de pluie, sauf sur les variétés avec des tiges et des pétioles plus minces. Le dépérissement est généralement commun par temps sec, les lésions sur les tiges blanchissent et se fissurent (Osiru, 2008). Ces lésions ou chancres progressent lentement sur la tige, une fois celle-ci ceinturée la plante meurt. Des petites lésions brunes apparaissent ensuite entre les plus grandes lésions (**figure 7 A**). Les tissus sous les chancres présentent une pourriture sèche brune en particulier au niveau du xylème, celui-ci est décoloré d'une façon discontinue à brun et peut se développer dans les tissus adjacents au xylème primaire d'environ 4 à 7 mm au-dessus et en dessous des chancres (Grogan *et al.*, 1975).



Figure 07 : Lésions provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata*; **A.** sur tige, **B.** sur collet.

5.4. Sur fruits et tubercules :

Le pathogène induit l'apparition de chancres sur fruit, en creux à l'aisselle du calice à partir de lésions sur sépales (Messiaen *et al.*, 1991). Une fois les fruits verts ou murs sont envahies, les tissus colonisés prennent progressivement une couleur noirâtre occasionnant de larges lésions circulaires concaves, parfois plissés en surface à la texture plutôt dure (**figure 8**). Un dense feutrage les recouvre a terme correspondant à la sporulation d'*Alternaria* (Blancard *et al.*, 2012). Selon Vloutoglou et Kalogerakis (2000) et Gani *et al.* (2013), l'alternariose de la pomme de terre est caractérisée par la présence de taches nécrotiques brunes sur les tubercules ou elles se développent sous forme de petites cavités noires. Sur fruit de tomate, une apparence d'anneaux concentriques à l'intérieur des lésions produites par *A. tomatophila* sont aussi observés (**figure 8 A**). Singh *et al.* (1987) ont rapporté que les taches sont de forme ovale à une forme angulaire mesurant jusqu'à de 0,3 à 0,4 cm de diamètre et le plus souvent avec une zone de chlorose autour de la lésion (**figure 8**).

Des travaux menés par Hathout *et al.* (1997) ont démontré que les tomates infectées par des champignons pathogènes, principalement *Alternaria spp.* Ont un taux d'acides aminés aromatiques; g-amino acide butyrique; tryptophane; la tyrosine et la phénylalanine plus élevé par rapport aux fruits sains.

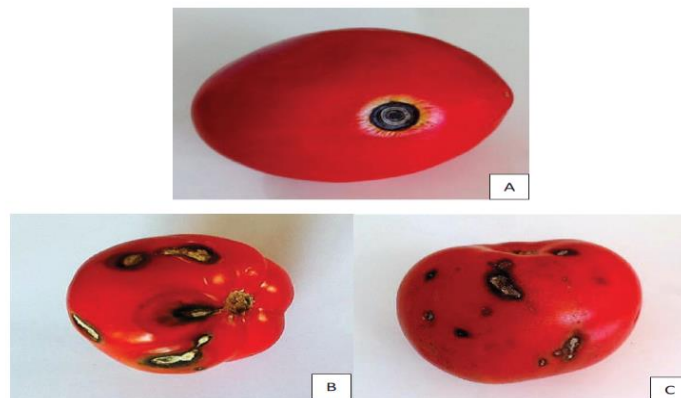


Figure 8 : Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par *Alternaria tomatophila*(A) et par *A. solani*(B), *A. arborescens* et *A. alternata*(C).

6. Cycle infectieux :

Le processus infectieux mis en place par les champignons du genre *Alternaria* pour infecter leur plante hôte peut se diviser en plusieurs stades : la conservation, la pénétration et l'invasion (protection vis-à-vis des défenses de l'hôte et production de facteurs nécrogènes), la sporulation puis la dissémination.

6.1. Conservation, sources d'inoculum :

Alternaria peut se conserver durant plusieurs années à la surface des graines de tomate, dans le sol et sur les débris végétaux, grâce à son mycélium mélanisé et ses conidies (Sherf et MacNab, 1986 ; Linas *et al.*, 1998). Les chlamydospores peuvent également servir de structures de survie (Basu, 1974 ; Patterson, 1991). Par conséquent, le cycle de vie du pathogène comprend sol et des semences ainsi que les étapes atmosphériques, ce qui rend l'agent pathogène difficile à contrôler par des moyens de rotation et de l'assainissement. Dans certaines régions du monde, il serait aussi capable de se maintenir d'une saison à l'autre sur d'autres

Solanacées comme la pomme de terre, l'aubergine, le poivron, la morelle noire (*Solanum nigrum*), *S. carolinense*, *S. pseudocapsicum* (Neergaard, 1945 ; Ellis et Gibson, 1975 ; Blancard *et al.*, 2012).

6.2. Pénétration et invasion :

Une fois que les spores entrent en contact avec les cellules végétales, leur germination peut se produire en 2 heures quand l'air est saturé en humidité à une large gamme de températures (de 8 ° à 32 °C) (Evans *et al.*, 1992). L'hydrophobicité de la cuticule est indispensable pour l'adhésion des conidies. Ces dernières germent et produisent un ou plusieurs tubes germinatifs en formant un mucilage fibreux de polysaccharides (mannose et rhamnose) ou de glycoprotéines qui permettent l'adhésion à la plante hôte (Hatzipapas *et al.*, 2002). La pénétration dans les tissus végétaux à travers les cellules de l'épiderme se fait directement à l'aide d'*appressoria* non mélanisées (Otani *et al.*, 1998 ; Cramer et Lawrence, 2003), qui entrent à travers les stomates ou blessures en fonction de la croissance fongique (Sherf et MacNab, 1986 ; Agrios, 2005) (Figure 7). La pénétration peut se produire à des températures entre 10 ° et 25 ° C (Sherf et MacNab, 1986). La stratégie de pénétration enzymatique chez les *Alternaria* est la plus évidente, la colonisation de l'hôte est facilitée par des enzymes (cellulases, la pectine galacturonase de méthyle). Le rôle crucial des lipases de type sérine estérase dans la dégradation de la cuticule semble clairement établi chez *A. brassicicola* (Berto *et al.*, 1997). L'addition d'anticorps anti-lipases, à une suspension de conidies, a pour effet de supprimer presque totalement l'apparition des symptômes (Berto *et al.*, 1999). Différentes cutinases induites, par la présence de monomères de cutines en surface du végétal, semblent également impliquées dans la pénétration du champignon dans sa plante hôte (Trailet Köller, 1993 ; Yao et Köller, 1995). *A. citri* semble dépendant de la présence d'endopolysaccharidases pour pénétrer son hôte, puisque le mutant déficient en cette enzyme est altéré dans sa capacité à établir une infection (Ishiki *et al.*, 2001). Ces métabolites dégradent la paroi cellulaire de l'hôte et par un certain nombre de toxines qui tuent les cellules de l'hôte et l'agent pathogène permettent de dériver des nutriments à partir des cellules mortes (Rotem, 1994). Le champignon envahit rapidement les tissus, les lésions deviennent visibles 2 à 3 jours après l'infection, et la production de spores se produit 3 à 5 jours plus tard (Sherf et MacNab, 1986 ; Blancard *et al.*, 2012).

6.3. Sporulation et dissémination :

Pour se protéger des phytoalexines et phytoanticipines synthétisées par la plante hôte les espèces d'*Alternaria* mettent en place différents mécanismes de détoxification (enzymatique, par conjugaison, système d'efflux). *A. solani* possède des enzymes à activités tomatinase qui protègent de la tomatine (phytoanticipine), une saponine synthétisée par la tomate (Sandrocket vanetten, 1998). Sur les tissus colonisés, quand les conditions climatiques sont humides, *Alternaria* ne tarde pas à produire de courts conidiophores (**figures 9 et 10**). Les spores sont disséminées par le vent, mais aussi par la pluie et à la suite d'arrosages par aspersion. La présence d'eau est nécessaire pour que la sporulation ait lieu (Messiaen *et al.*, 1991). Les travailleurs, notamment *via* leurs outils, contribuent également à la dissémination de l'alternariose. Les conidies produites assurent des contaminations secondaires et par la suite plusieurs cycles parasitaires pourront avoir lieu dans la culture (Sherf et MacNab, 1986 ; Andersen et Frisvad, 2004 ; Leiminger *et al.*, 2010 ; Blancard *et al.*, 2012) (**figure 9**).

6.4. Conditions favorables à son développement :

Cette alternariose est favorisée par des hygrométries élevées et des températures comprises entre 18°C et 30°C. Les rosées, de faibles précipitations continues (5 mm) ou des irrigations par aspersion suffisent à son extension, mais elles doivent être répétées pour que la maladie évolue rapidement. La plupart des travaux en aeromycology démontrent que le rapport des spores d'*Alternaria* dans des échantillons d'air dans les climats tempérés et humides, diffère de quelques-uns à plusieurs dizaines de pour cent (Rosas *et al.*, 1990 ; Mitakakis *et al.*, 1997 ; Sten-nett et Beggs , 2004 ; Maya- Manzano *et al.*, 2012). Les plantes stressées, mal fumées ou très chargées en fruits seraient plus sensibles. La maladie ne prend jamais un caractère explosif mais s'accroît progressivement avec le temps, au fur et à mesure du vieillissement des plantes, et devient grave en fin de saison (Blancard *et al.*, 2012).

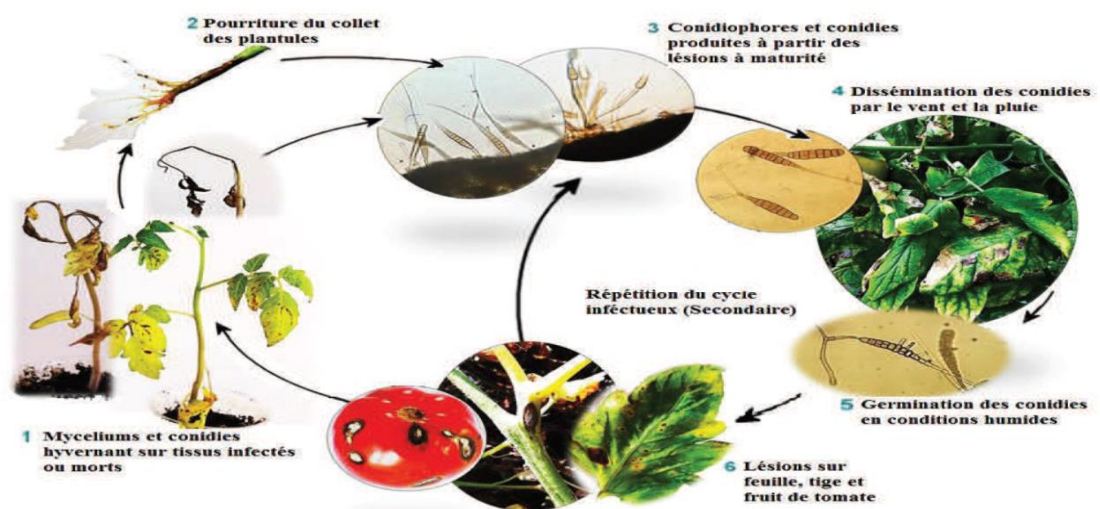


Figure 9 : Cycle infectieux de l'Alternariose

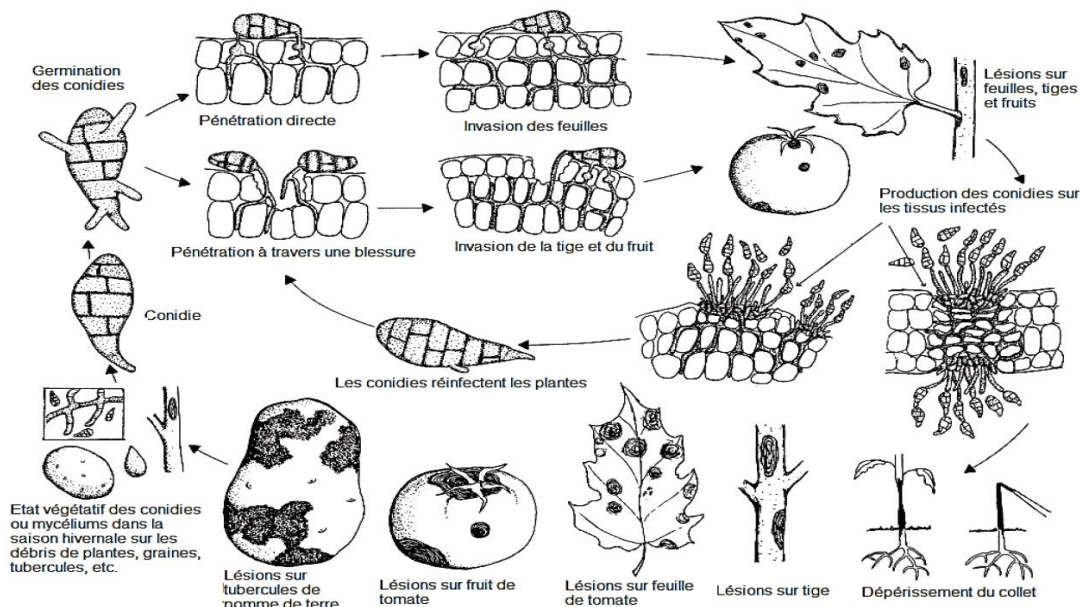


Figure 10 : Le processus d'infection, le développement et les symptômes des maladies causées par *Alternaria* pathogènes des *Solanacées* (Agrios, 2005 ; Chaerani et Voorrips, 2006).

7. Méthodes de lutte contre *Alternaria* :

7.1. La lutte biologique :

L'essor de la lutte biologique a longtemps été freiné par la position dominante de la lutte chimique dans les systèmes de productions intensifs. Elle vise à contrôler les agents pathogènes aux moyens d'agents de lutte biologique (Biological control agent : BCA) ainsi que les produits qu'ils en dérivent (Lepoivre, 2003). Plusieurs antagonistes potentiels sont signalés dans la littérature : des bactéries (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus spp.*, etc.) comme des champignons (*Trichoderma polysporum*, *Chaetomium globosum*...) ; leurs performances ne semblent toutefois pas importantes en situation d'épidémie naturelle (Blancard *et al.*, 2012).

Quelques études de cas sur *Trichoderma spp.* connu depuis longtemps (Bisby, 1939), est utilisé comme agent de lutte contre les phytopathogènes du sol (Baker et Cook, 1974 ; Papavizas *et al.*, 1982), ce champignon a une adaptation écologique très large, sa capacité à croître sur des substrats très peu coûteux, en font un candidat potentiellement intéressant pour de nombreuses applications en lutte biologique (Amsellem *et al.*, 1999). Les propriétés antagonistes des *Trichoderma spp.* s'expliquent par la compétition pour les éléments nutritifs, l'antibiose ainsi que le parasitisme (Yedidia *et al.*, 2000). *Trichoderma spp.* est commercialisé pour lutter contre les agents de fontes de semis, il occupe 50% des BCA fongique mis sur le marché (Verma *et al.* 2007).

Un autre exemple de travaux menés sur *Bacillus spp.* autant qu'agents de lutte contre les pathogènes des produits récoltés et stockés (Sharma *et al.*, 2009). Le premier travail sur le contrôle de la pourriture brune des fruits à noyau par *Bacillus subtilis* était initié par Pusey & Wilson (1984) ; depuis, beaucoup d'antagonistes ont été identifiés et utilisés pour le contrôle de l'alternariose sur différents fruits et légumes (**Tableau 6**). L'inoculation artificielle par des agents antagonistes est plus efficace pour le contrôle de l'alternariose sur fruits et légumes que d'autres moyens.

Des produits à base de *Bacillus* sont couramment utilisés en agriculture comme biopesticides, fongicides et stimulateurs de la croissance chez les plantes. Certaines espèces de *Bacillus* ont aussi un effet bactéricide et nématocide (Pérez-Gacia *et al.*, 2011). Le contrôle biologique des phytopathogènes par *Bacillus* est principalement due au rôle des lipopeptides Fengycine et iturine, ces derniers ont été largement caractérisés comme composés antifongiques contre plusieurs champignons et oomycètes phytopathogènes (Romeo *et al.*, 2007 ; Ongena & Jacques, 2008 ; Arrebola *et al.*, 2010). L'iturine peut également avoir un potentiel antibactérien supplémentaire. Les lipopeptides fengicine et surfactine (Tendulkar *et al.*, 2007), semblent agir comme déclencheurs pour l'activation de la résistance systémique induite (ISR) au niveau de la racine de la plante hôte, conduisant à la suppression ou à la réduction des maladies des plantes causées par des agents pathogènes transmis par le sol et l'air (Ongena *et al.*, 2007 ; Choudhary et Johri, 2009). Les lipopeptides surfactine sont essentiels pour la motilité. Les surfactines agissent comme des molécules de signalisation pour la formation de biofilms qui semblent être nécessaire pour la colonisation de la surface des racines et des feuilles par les bacilles associées aux plantes (Jourdan *et al.*, 2009).

Tableau 6 : Quelques antagonistes microbiens utilisés pour le control des *Alternaria* spp. Sur fruits et légumes.

| Antagoniste | Pathogène | Fruits/légume | Référence(s) |
|--|---|-------------------|---|
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | <i>Alternaria solani</i> | Tomate | Brame et Flood (1983) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler | Litchi | Jiang <i>et al.</i> (1997, 2001) |
| <i>Bacillus sp.</i> | <i>Alternaria solani</i> | Tomate | Sabriye <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> | <i>Alternaria alternata</i> et <i>Penecillium expansum</i> | Jujube | Qin et Tian (2004) Tian <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> Homaech & Edwards | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler | Cerise | Utkhede et Sholberg (1986) |
| <i>Debaryomyces hansentii</i> | <i>Alternaria sp.</i> | Tomate | Chalutzet <i>al.</i> (1988) |
| <i>Pichiaguilliermondii</i> | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler | Tomate | Chalutzet <i>al.</i> (1988) |
| <i>Rhodosporidium paludigenum</i> | <i>Alternaria alternata</i> | Tomate cerise | Yifeiet <i>al.</i> (2008) |
| <i>hodotorulaglutinis</i> | <i>Alternaria alternata</i> | Jujube | Tian <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Streptomyces longisporus</i> | <i>Alternaria solani</i> | Pomme de terre | Chattopadhyay et Nandi (1982) |
| <i>Trichodermaharzianum</i> | <i>Alternaria solani</i> | Tomate | El-Farnawany (2006) |
| <i>Trichoderma spp.</i> | <i>Alternaria alternata</i> | Cerise | Qin <i>et al.</i> (2004) |

8. Conservation des souches de champignons :

Les souches de champignons filamenteux sont conservées à -80°C soit sous forme de cryobilles soit sous forme d'implants.

- ❖ Pour conserver les souches de champignons filamenteux par cryoconservation en utilisant des cryobilles, 5 ml de glycérol à 10 % sont déposés a la surface d'un tube de gélose en pente contenant une culture fongique. Le tube est agité au vortex afin de mettre les spores en suspension. Ensuite, 2 ml de suspension sont récupérés au sein d'un tube Eppendorf et une centrifugation de 12 minutes a 3500 g est réalisée. Le surnageant est élimine jusqu'a ce qu'il ne reste plus qu'environ 0,5 ml de celui-ci, le culot est réhomogénéisé et 0,5 ml sont ensuite prélevés à l'aide d'une pipette de transfert et déposés au sein d'un cryotube contenant 25 cryobilles (AES Chemunex/Biomérieux). Le cryotube est homogénéisé par retournement et après un temps de d'attente de 30 secondes, le surnageant est éliminé a l'aide d'une pipette de transfert. Le cryotube est ensuite stocké à -80°C (**Figure 11**).
- ❖ Pour conserver les souches de champignons filamenteux par cryoconservation en utilisant des implants, des petits carrés de gélose de 0,5 sur 0,5 cm sont découpés à partir d'une gélose sur boîte de Pétri contenant a sa surface une culture fongique. Les petits carrés de gélose sont ensuite transférés au sein d'un cryotube et 1 ml de glycérol à 10 % est ajouté. Le cryotube est ensuite stocké à -80°C (**Figure 12**). Cette méthode de cryoconservation est essentiellement utilisée pour les souches ne sporulant que très peu et/ou très lentement.

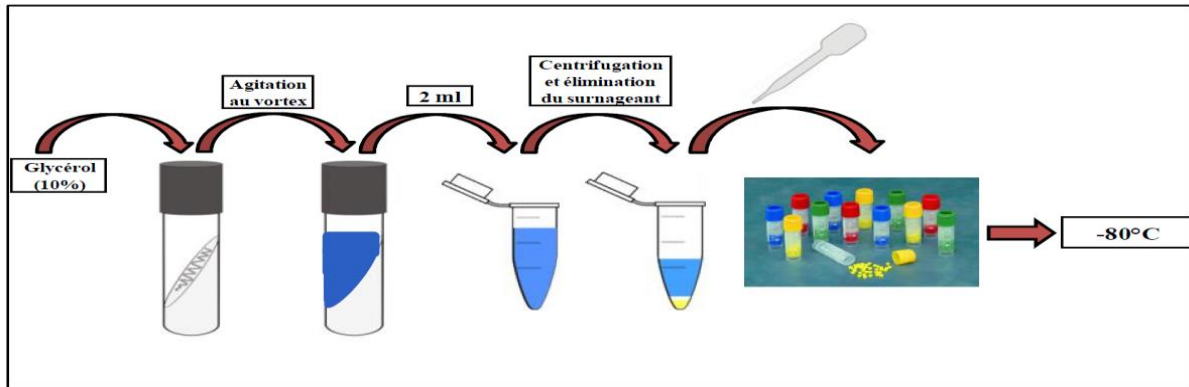


Figure 11 : Schématisation du protocole de conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à l'aide de cryobilles.

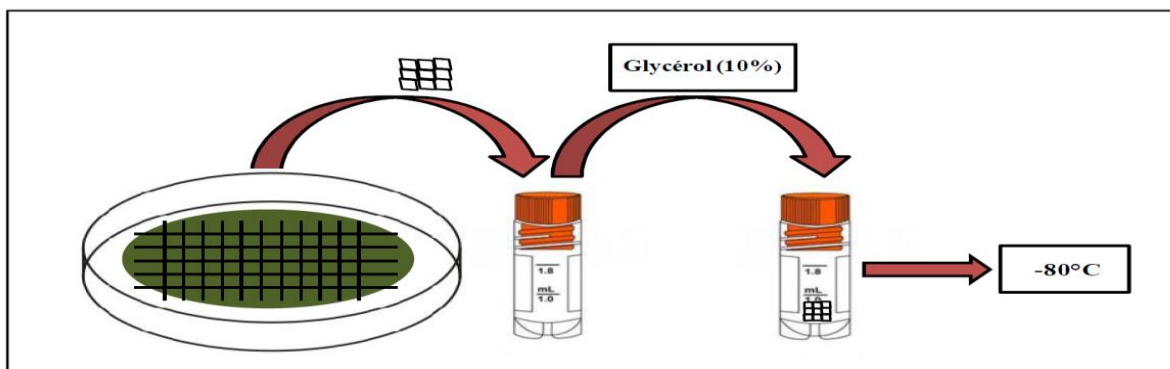


Figure 12 : Schématisation du protocole de conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à partir d'implants de gélose.

8.1. Conservation des isolats :

La collection d'isolats est conservée à partir des cultures pures cultivées sur PSA incliné entube ou en boîte, âgées de sept jours, maintenues dans un réfrigérateur à 4°C pour des utilisations ultérieures. La conservation est aussi effectuée dans des cryotubes de 1,5ml contenant cinq implants mycéliens d'un cm de diamètre supplémentés avec 1 ml de glycérol à 30%. Ces cryotubes sont placés dans un congélateur à -80°C pour un stockage à long terme.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels :

1. Matériel biologique :

- **Bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques ont été principalement fournies par Mr ZABOURI enseignant au département des sciences infirmières à l'université de Mostaganem, identifiées par la biologie moléculaire ; les bactéries lactiques sont : 1 souche *Lactobacillus plantarum* et 3 souches *Eterococcus facium* et une souche *Enterococcus lactis* isolés à partir du Lait de chamelle, chèvre et lait de vache. (**Tableau 7**).

Tableau 07 : déchiffrage des souches lactique.

| Les souches | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Eterococcus lactis</i> | <i>Eterococcus facium</i> |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Chiffres | 4.18 | 10 | 14.2/4.19/35 |

- **Les souches fongiques :**

Les souches fongiques ont été également fournies par Mr ZABOURI enseignant au département des sciences infirmières à l'université de Mostaganem, identifiées par la biologie moléculaire ; les champignons sont : 4 souches d'*Alternaria Alternata spp.*

2. Milieux de culture :

Les milieux de culture sont : milieu MRS (liquide et solide), milieu sélectif pour les bactéries lactiques, et milieu de culture PDA (potato dextrrose agar). La gélose à la pomme de terre et au dextrose (PDA) est le milieu le plus largement utilisé pour la croissance des champignons. (**Harold Eddleman**, p.H. D (February 1998)).

II. Méthodes :

1. Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches et leurs appartenances au groupe lactique :

Les souches conservées dans du glycérol à -20°C sont décongelées et repiquées plusieurs fois dans leurs milieu sélectif d'enrichissement MRS liquide puis incubées pendant 24 à 48h à 37°C.

Après repiquage, un l'ensemencement a été réalisé : 1ml en surface du MRS solide avec la méthode d'épuisement de charge (méthode des quadrants) et incubé 24 h à 30°C.

La pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques.

2. Conservation des bactéries lactiques :

2.1. Conservation à courte durée

Elle consiste par ensemencement des souches conservé préalablement, isolées sur gélose MRS inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à +4°C à l'obscurité et un repiquage est nécessaire toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2003**). (Figure 13).

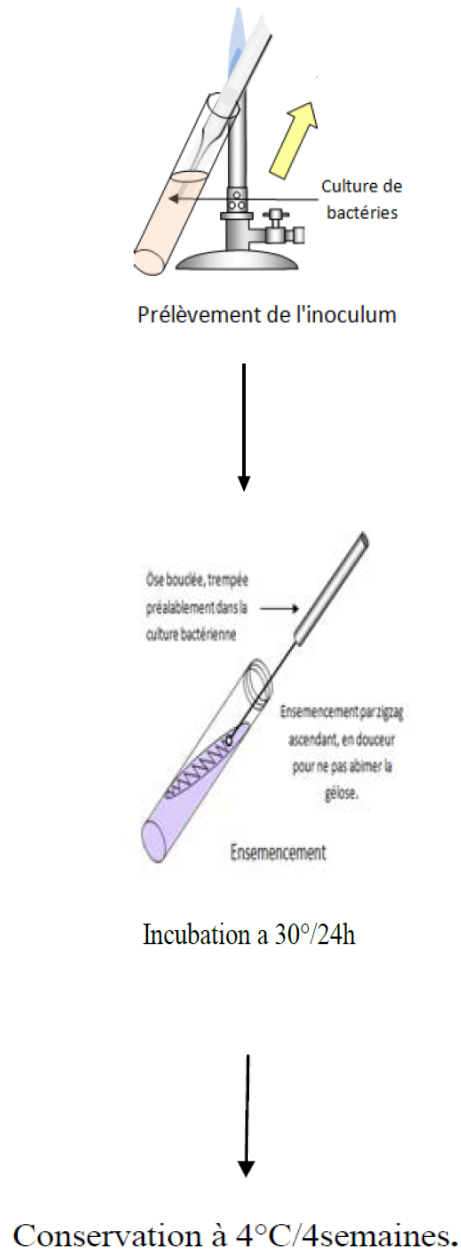


Figure 13: Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (**Badis et al., 2003**).

2.2. Conservation à longue durée

Elle se fait par ensemencement des souches dans des Eppendorf, les cultures lactiques jeunes à raison de 70% additionné de 30% de glycérol et on les place dans le congélateur à -20°C (Badis *et al.*,2003).(Figure 14)

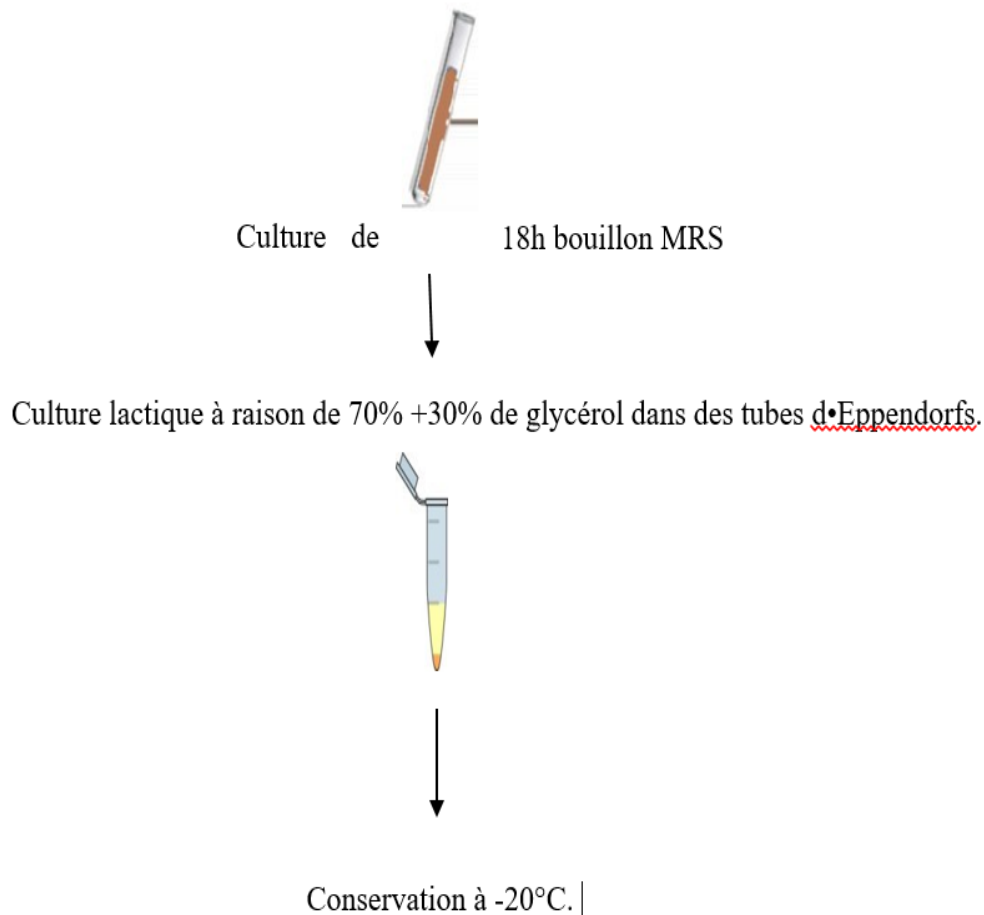


Figure 14: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Badis *et al.*,2005)

3. Conservation des souches fongiques :

La conservation de courte durée se fait sur gélose PDA inclinée en tube conservé à 4°C, les repiquages se font toutes les deux semaines.

4. confirmation des bactéries lactiques :

4.1. Tests morphologiques :

A. L'aspect macroscopique :

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis *et al.*, 2005).

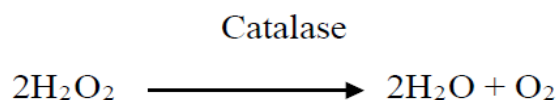
B. L'aspect microscopique :

❖ Coloration de Gram :

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors la lame coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ seront violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fushine pour colorer les cellules Gram-présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché et examiner à l'objectif à immersion (grossissement X 100) (Singleton, 1999). Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).

4.2. Tests physiologiques :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase -) des entérobactéries (catalase +). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal *et al.*, 1991).

5. confirmation des souches fongique :

5.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques :

Cette identification des *Alternaria* sp. Repose sur des critères qui font appel aux caractères culturels (texture du mycélium, couleur du thalle ou de l'envers de la colonie), et à la taille des spores. Le diagnostic comprend deux parties : la détection du pathogène et l'identification de celui-ci selon la taille et l'agencement des conidies en cultures pures. (BESSADAT Nabahat., 2014).

6. La recherche de l'activité antifongique :

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

6.1. Préparation de suspension monosporale :

Alternaria alternata Est cultivé sur milieu PDA à 30° C pendant 5 jours, puis 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte, cette suspension est filtrée sur papier Wathman No= 100 mm et dénombrée par cellule de Malassez.

6.2. Test qualitatif : Méthode de confrontation :

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

6.3. Test quantitatif : Méthode des puits :

Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983) :

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grande zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide.

Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min.

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur MRS solide inoculé par la suspension

monosporale de champignonnet seront remplies avec 100 μ L du surnageant. Les boîtes de Petri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji *et al.*, 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem *et al.*, 2011). (Figure 15).

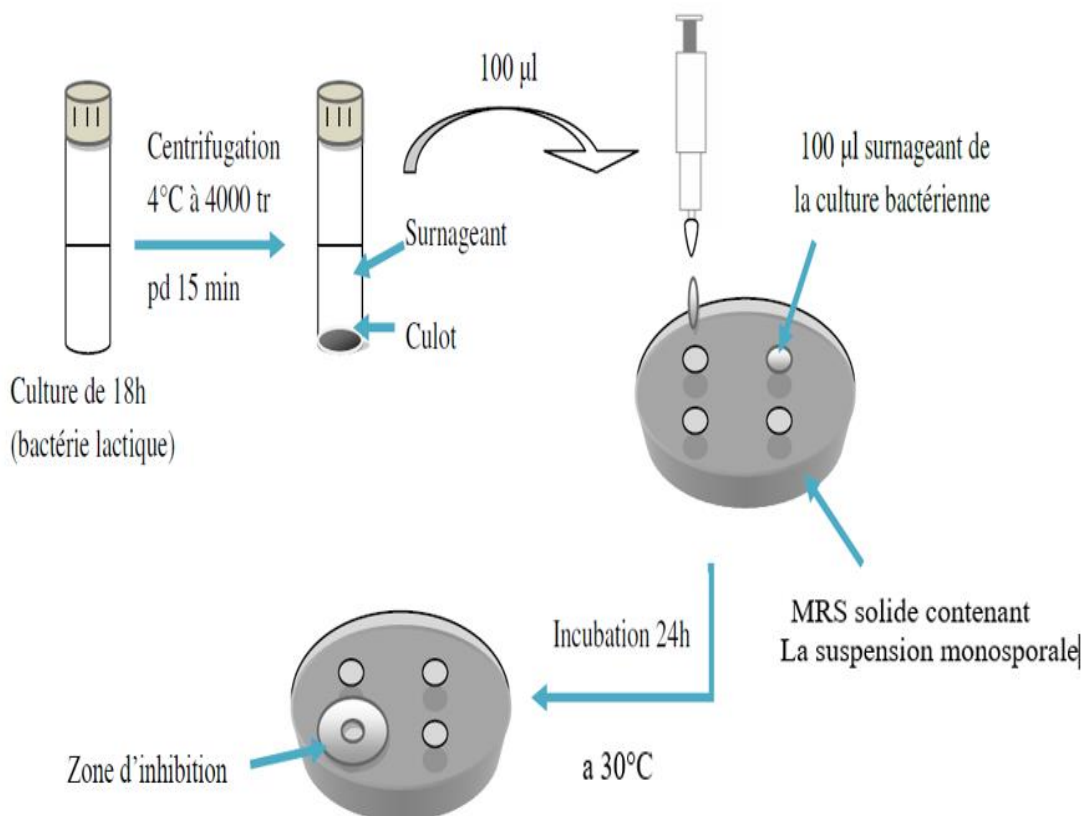


Figure 15 : Les différentes méthodes utilisées pour la recherche de substances antimicrobienne.

7. Caractérisation des métabolites antifongiques :

L'activité de bactériocine a été étudiée après traitement du surnageant brut actif par différentes valeurs de ph ou après un traitement thermique.

7.1. L'effet de la température :

Effet de température est réalisée par un chauffage du surnageant brut actif à une température de 4°C, 45°C, 90°C, 30°C pendant 20 min (Stiles et Holzapfel, 1997; Teuber et Geis, 2006) après refroidissement est testé en utilisant le milieu MRS liquide. Le chauffage est réalisé dans un bain-marie.

L'étude se fait selon la Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983) décrite précédemment.

7.2. L'effet des enzymes protéolytiques :

L'effet des enzymes protéolytiques a été déterminé selon la méthode décrite par Hirsch (1979), 10 µl de l'enzyme [chymotrypsine, pepsine, lysozyme (1 mg/ml, préparé dans 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)] tous les enzymes ont été dissoute dans la solution tampon, elles ont ajoutées au surnageant brut actif.

0.1 ml de la suspension monosporale (10^3 spores/ml) sont ensuite versés sur la boîte. Les zones d'inhibition ont été évaluées après trois jours d'incubation à 30°C dans les boîtes traitées par les enzymes et une boîte non traitée.

7.3. L'effet du pH :

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode décrite par Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983) : avec un changement du pH du milieu MRS liquide à 2, 4, 6.8 et 9.puis incubation pendant 18h à 30°C.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats et discussion :

1. Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :

Lors de cette étude la confirmation de l'identité des souches est faite par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (Carr *et al.*, 2002).

1.1. Critères morphologiques :

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies circulaires, bombées et de couleur blanche, leur taille est d'environ 1mm à 2 mm de diamètre (**Figure 16**),

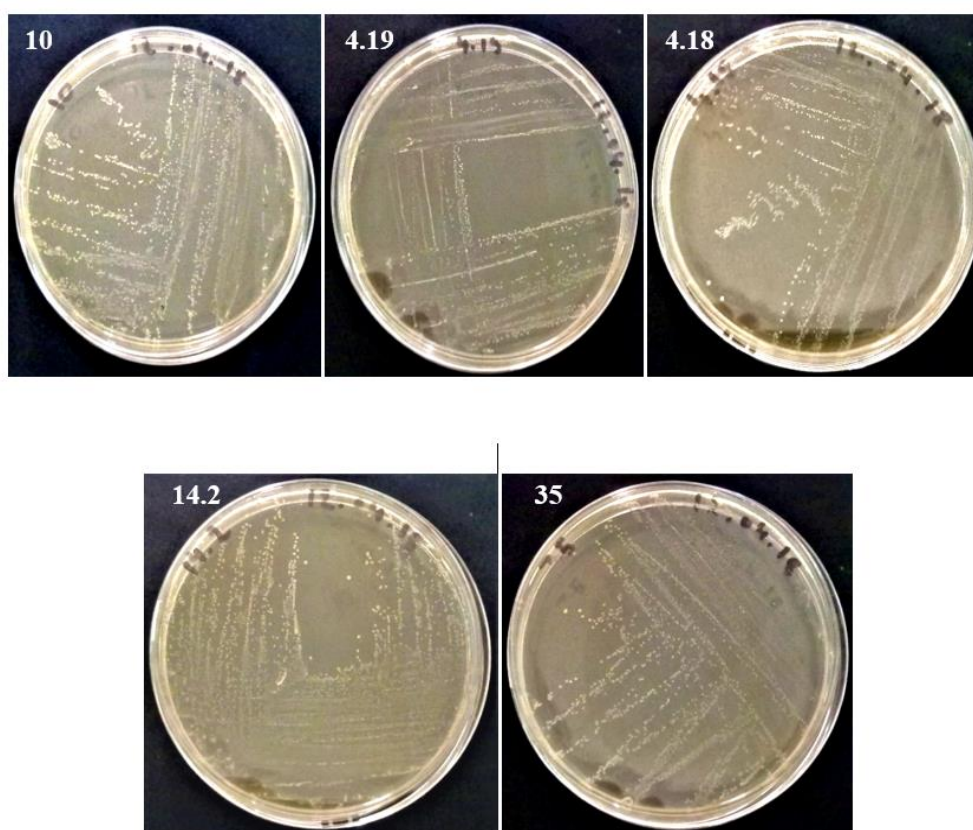


Figure 16 : Aspect macroscopique des souches lactiques en milieu MRS solide.

L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélée deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes (**Figure(17) B**), mais les bâtonnets présents des cellules associées en paires ou en courtes chaînettes (**figure(17) A**).

L'observation microscopique a montré que toutes les souches sont Gram positif, se présentent sous forme de coques disposés en diplocoques et en chaînettes et leurs aspects microscopiques sont notés dans la (**Figure 17**).

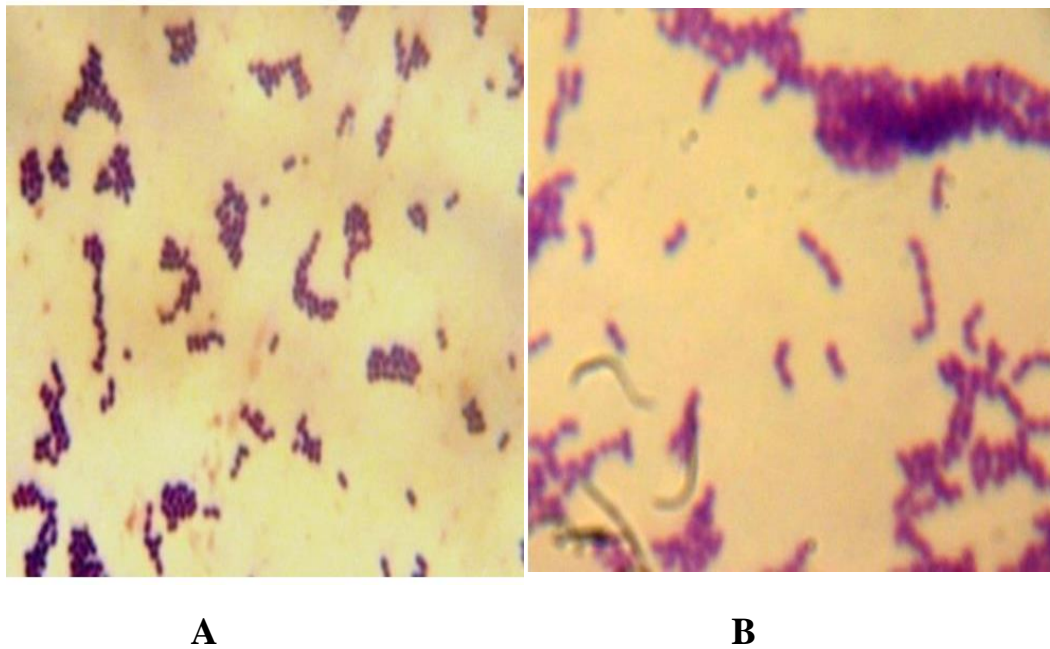


Figure 17 : Observation microscopique de la souche *Lactobacillus plantarum*(A) et *Enterococcus sp* (B) après coloration de Gram (G x100).

1.2. Tests physiologiques :

➤ Test de la catalase

Les bactéries lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O_2)) elles sont dites catalase négatives.

Les bactéries 4.18, 10, 4.19, 35, 14.2 répondent bien aux caractéristiques des bactéries lactiques comme le montre la (figure 18).

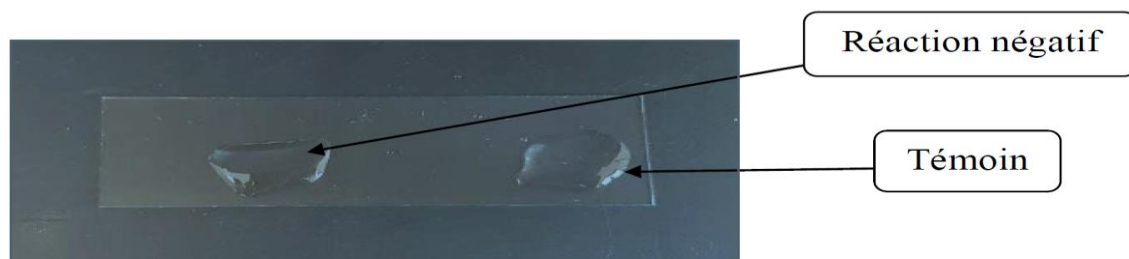


Figure 18 : Résultat de test de la catalase

2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques d'*Alternaria alternata* :

2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques :

Quatre isolats fongiques de différentes origines sont sélectionnés pour une caractérisation morphologique des colonies sur milieu pomme de terre agar (PDA). Les résultats ont révélé une variation considérable entre les caractères macroscopiques des isolats. (**Figure : 19**) La couleur de la colonie varie du clair au foncé à une teinte olivâtre verdâtre ou grisâtre. La majorité des colonies ont un aspect duveteux ou cotonneux, de légères variations de la croissance mycélienne avec des bordures régulière ou irrégulière, avec ou sans zones concentriques. Ces observations sont en accord avec ceux de Rai et Kumari *et al.* (2009) ont observé différents isolats d'*Alternaria*. (**Figure 19**).

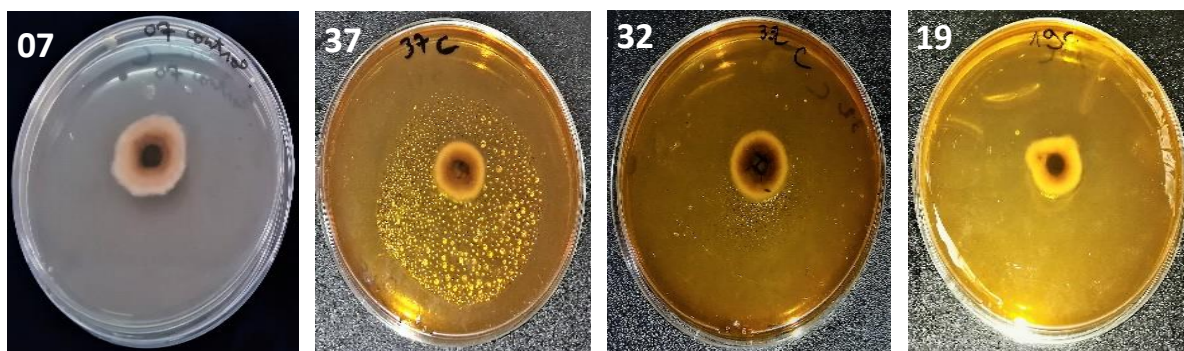


Figure 19 : Evaluation des caractères morphologique microscopique *Alternaria alternata*.

2.2. Evaluation des caractères morphologiques microscopiques :

Tableau 08: Caractéristiques morphologiques d'*Alternaria alternata*.

| Genres et espèces | Colonies | Mycélium (hyphe) | Conidies et spores | Référence bibliographique |
|-----------------------------|-------------|------------------|---|---|
| <i>Alternaria alternata</i> | Thalle noir | Cloisonné | conidies en chaînes simples ou ramifiées, brunes, irrégulières, 20-80 x 9-18µm, plus souvent avec un rostre apicale court mais bien différencié (Figure20 et 21) | (BOTTON <i>et al.</i> , 1990) (BARNETT <i>et al.</i> , 1972) |

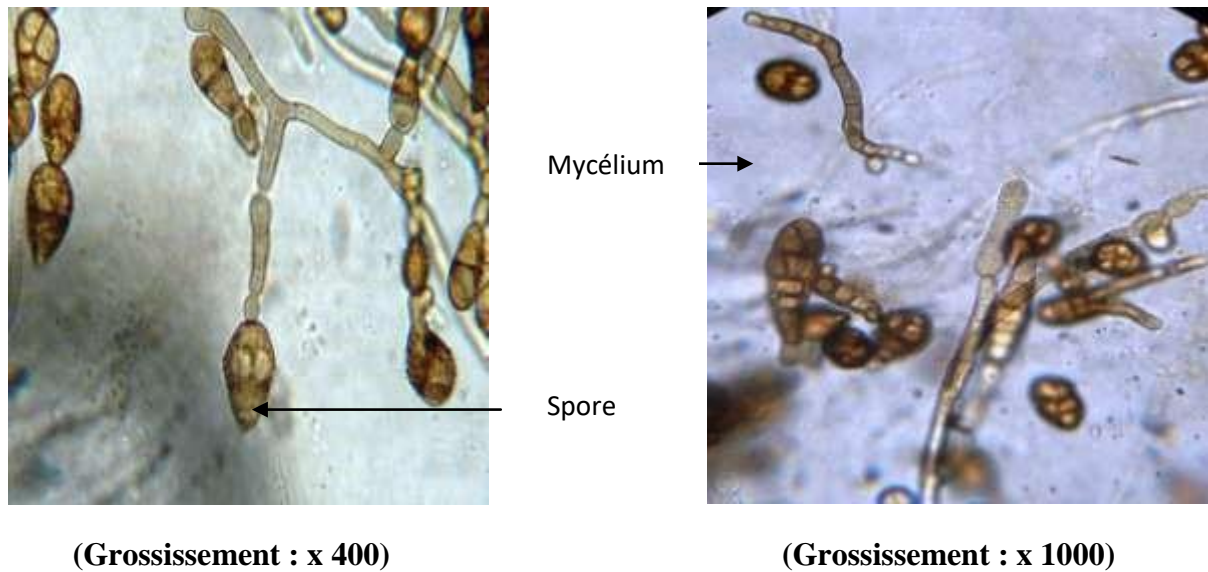


Figure 20 : *Alternaria alternata* sur microscope.

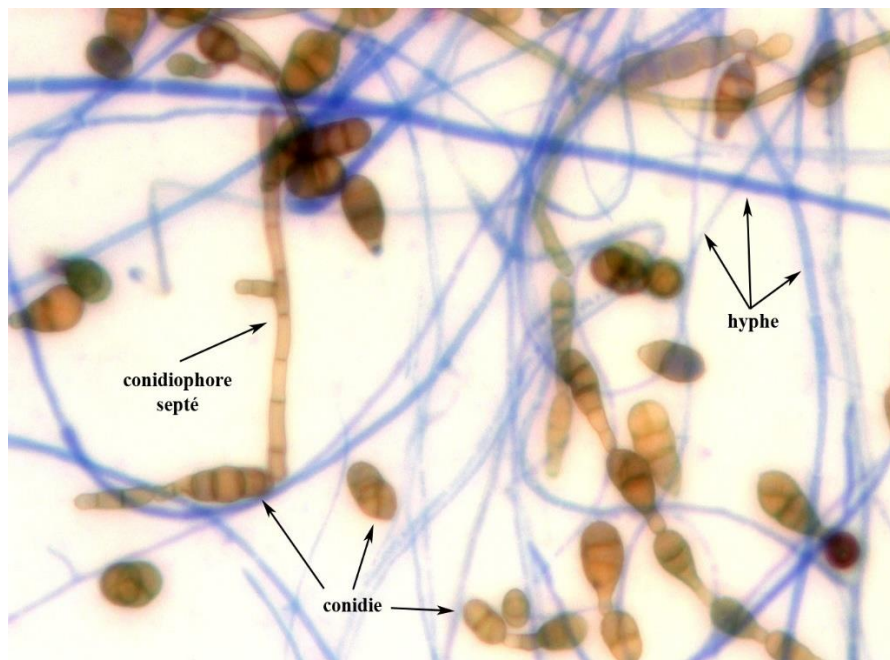


Figure 21 : Schéma explicative d'un champignon *Alternaria alternata* (BOTTON et al, 1990)

3. La recherche de l'activité antifongique :

3.1. Méthode de confrontation :

La production de substances antifongiques envers *Alternaria alternata*. à été recherchée par la méthode de confrontation (méthode des stries), les bactéries lactiques, isolées du lait de chamelle et lait chèvre et lai de vache. Les résultats ont montré que tous les souches présentaient une activité antifongique sont des 3 souches d'*Eterococcus facium* et deux souches *lactobacillus plantarum* et

Enterococcus lactis (Figure 22a et b, Tableau 09). Tous les souches ont montré une inhibition totale.

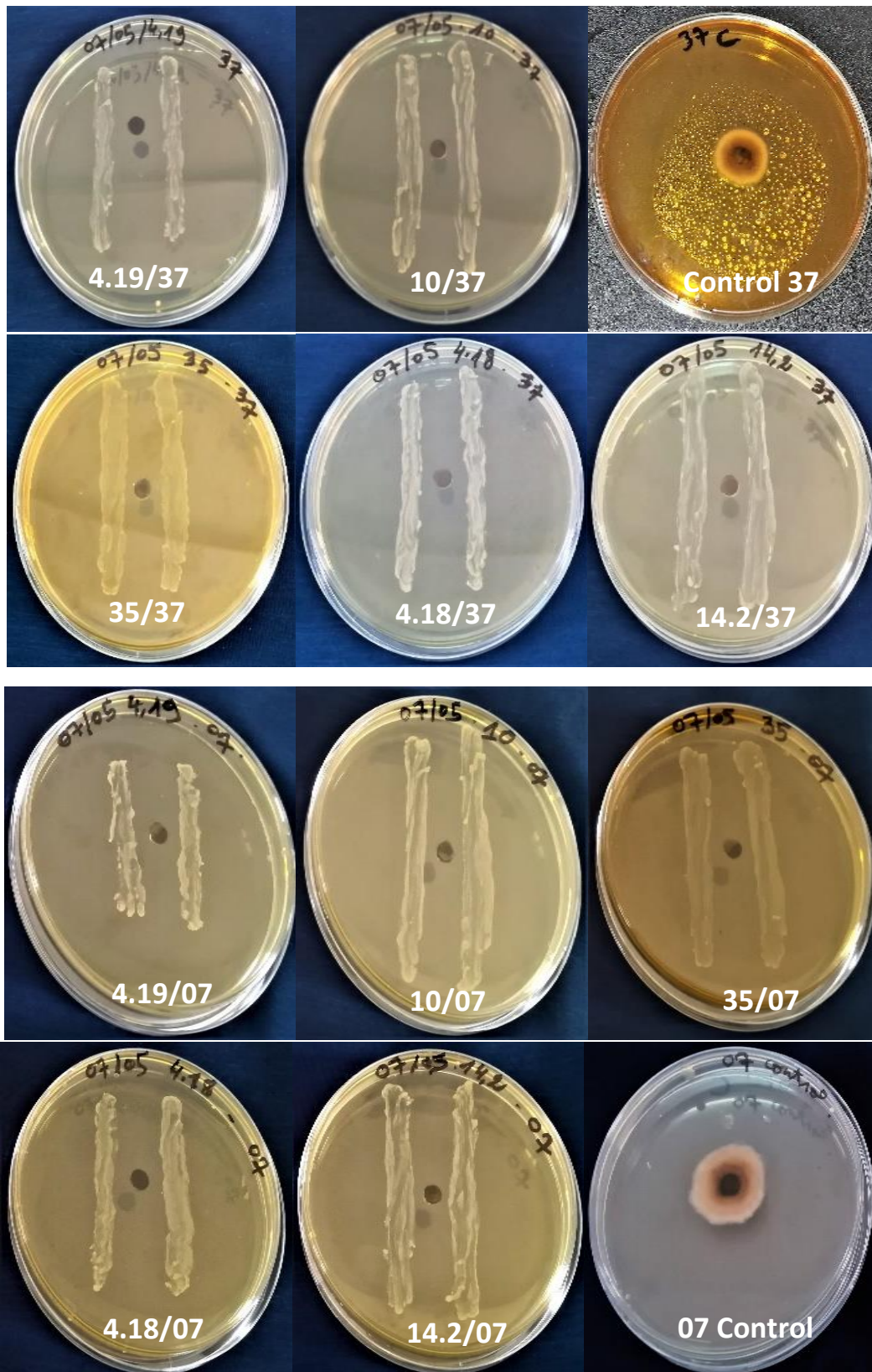


Figure 22a : Activité antifongique par confrontation. trois Souches d'*Eterococcus facium* (4.19, 35 et 14.2) et une souche de *Lactobacillus Plantarum* (4.18) et une souche d'*Eterococcus lactis* (10).

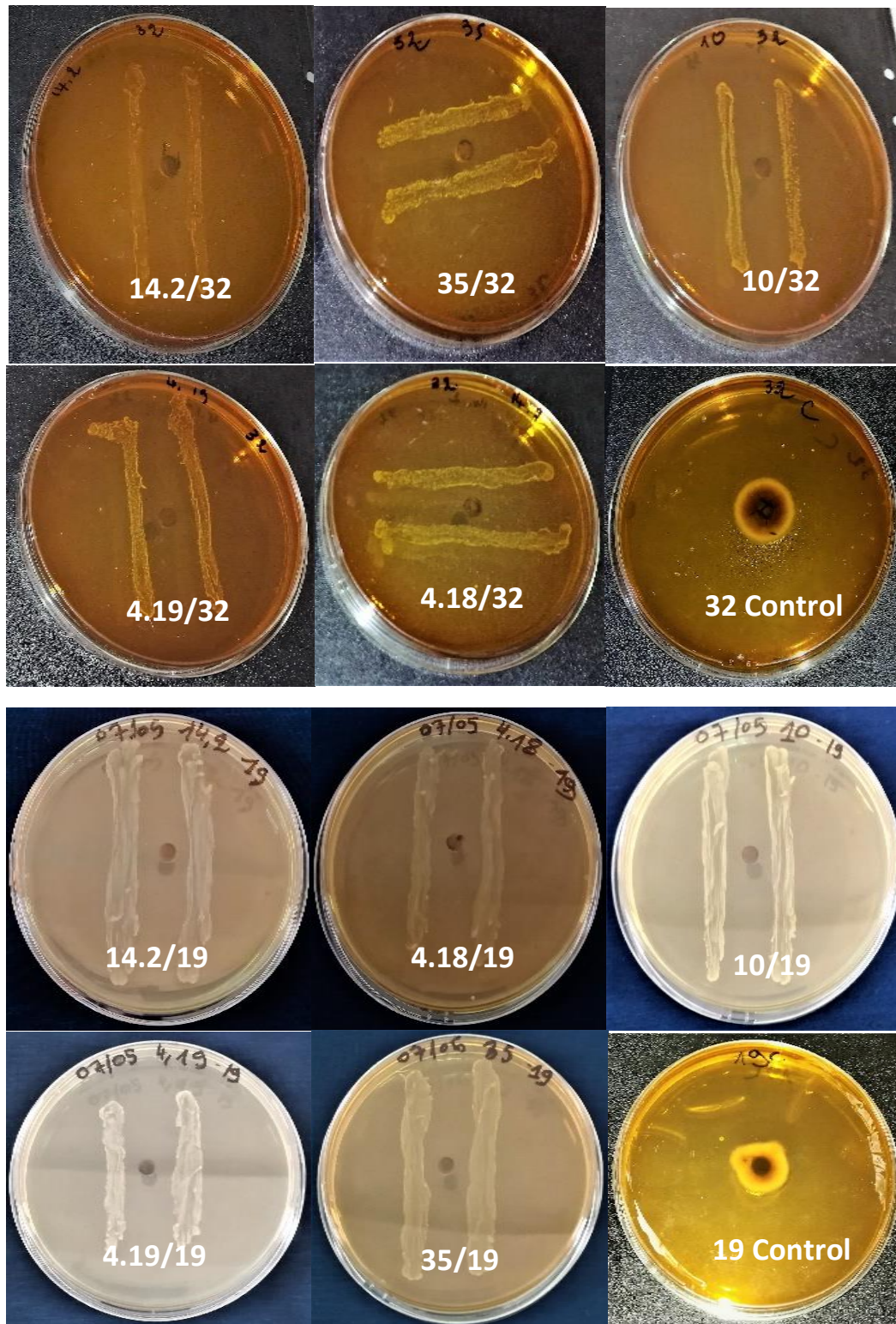


Figure 22b : Activité antifongique par confrontation. trois Souches d'*Eterococcus facium* (4.19, 35 et 14.2) et une souche de *Lactobacillus Plantarum* (4.18) et une souche d'*Eterococcus lactis* (10).

Tableau 09 : Activité antifongique par confrontation.

| Souche | Méthode de Confrontation | | | | |
|--------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 07 | 17 | 19 | 32 | 37 |
| 35 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 10 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 14.2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 4.18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 4.19 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

+++ = aucune croissance. S : souche Ch : champignons

3.2. Méthode des puits :

Les souches lactiques ont une activité antifongique vis-à-vis des champignons phytopathogènes qui se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions de différents diamètres. Les résultats sont présentés dans (Figure 23).

Une activité antifongique a été détectée par le surnageant de certain souches (Figure 23).

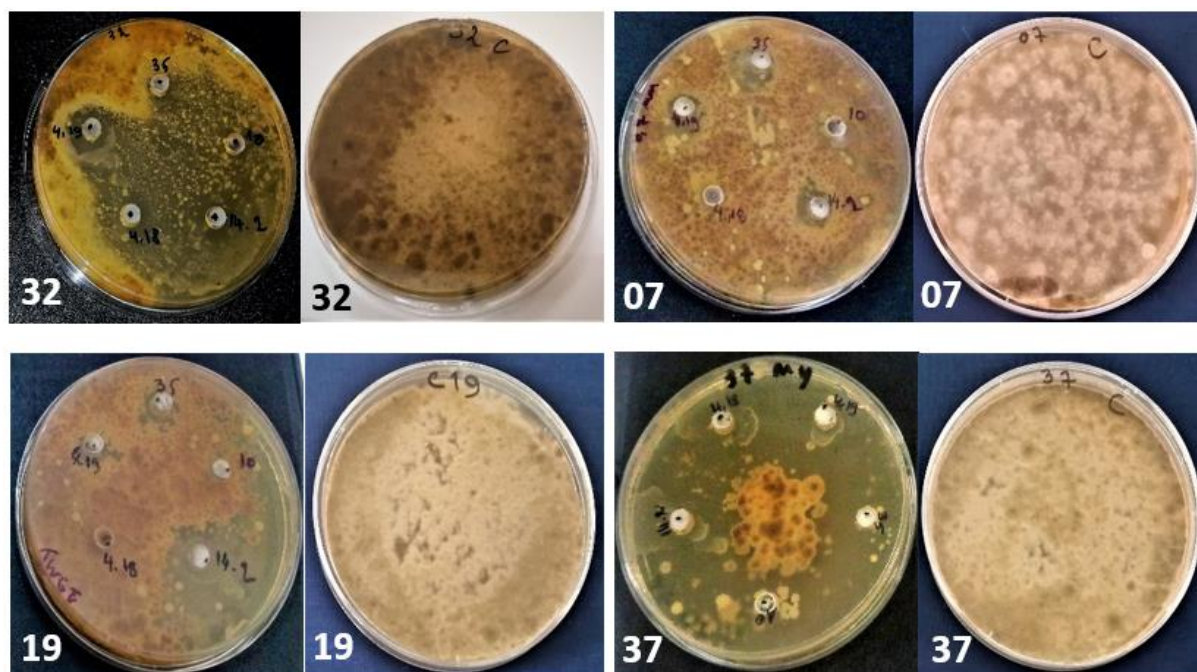


Figure 23 : Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les champignons phytopathogènes.

L'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été significativement différent d'une souche à l'autre. (**Figure 23**).

En effet, pour le champignon 32 les diamètres de zone d'inhibition sont entre 20 à 35 mm alors que les diamètres des champignons 07 et 19 sont de 8 à 29 mm et on a des diamètres élevés compris de 35 mm pour *tous les souches bactériennes* (35, 10,14.2, 4.18, 4.19) vis-à-vis le champignon 37.

Un effet fortement inhibiteur de la bactérie *Eterococcus facium* 14.2 qui donné un parentage d'inhibition entre 82 et 100% vis-à-vis les champignons 32/37/19 et un effet modéré pour le champignon 07 à un pourcentage de 22%. (**Figure 24**).

Pour les souches bactériennes 10/4.18/35/4.19 un effet fortement d'inhibiteur est observé ; vis-à-vis les champignons 32/37 a un pourcentage d'inhibition entre 72% et 100%, et un effet modéré vis-à-vis les champignons 19 et 07 à un pourcentage d'inhibition entre 14% et 43. (**Figure 24**).

L'activité antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes pathogènes a été confirmée par plusieurs travaux.

Dans cette étude, nous avons étudié les propriétés antifongiques de trois souches d'*Eterococcus facium* (4.19/35/14.2) et deux souches de *Lactobacillus Plantarum* (4.18) et *Eterococcus lactis* (10). L'activité antifongique de *Lb. plantarum* a également été rapportée par d'autres auteurs: Laitila *et al.* (2002) ; Sjögren *et al.* (2003) ; Ström *et al.* (2005) ; Sathe *et al.* (2007) ; Delavenne *et al.* (2012).

La souche de *Lb. Plantarum* ont inhibé la germination des conidies et la croissance mycélienne, les conidies étaient plus sensibles que le mycélium. Ces résultats à ceux obtenus par Muhialdin et Hassan (2011). La croissance mycélienne a été inhibée en confrontation directe (deux lignes).

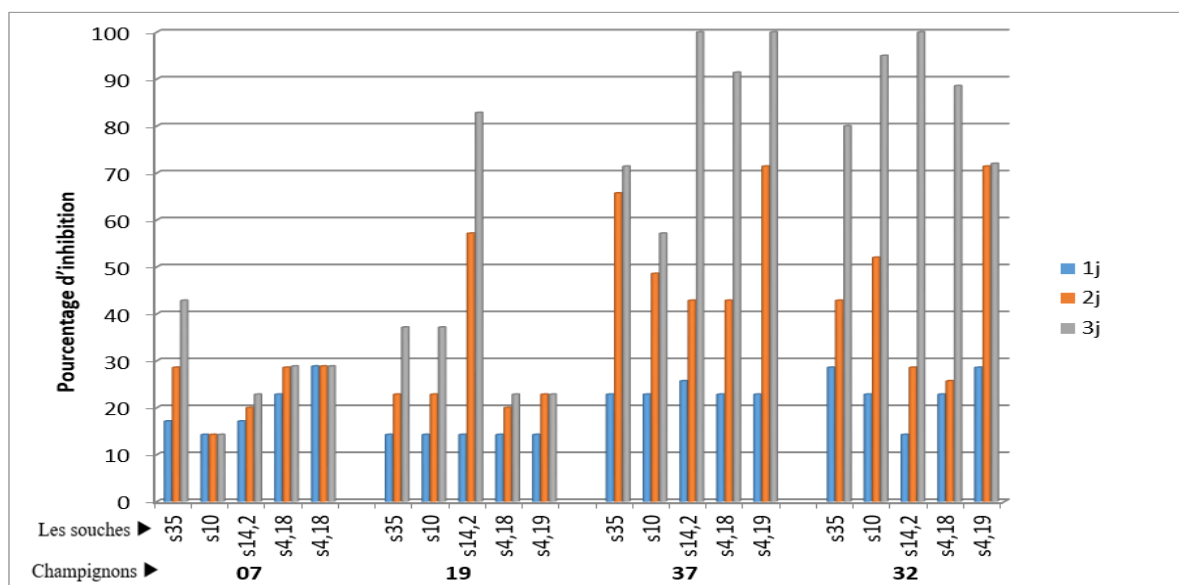


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition d'*Aalternaria alternata* sp. Par les métabolites des lactobacillus plantarum et Enterococcus facium.

4. Caractérisation des métabolites antifongiques :

4.1. L'effet de la température :

L'effet du traitement thermique a été examiné en traitant le surnageant pendant 30 minutes aux différentes températures : 4°C / 30°C / 45°C / 90°C. Avant d'être examiné pour leur activité antifongique.

L'effet de températures sur l'activité de surnageant a été déterminée par diffusion en puits vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

On constate que cette substance reste stable pendant 30 min de 4°C jusqu'à 90°C., les résultats sont similaire avec (Amel MAMECHE-DOUMANDJI., 2007-2008) et (Parada et al., 2007).

Le composé inhibiteur produit par les isolats lactiques a été considéré comme thermostable.

Les résultats de la (**Figure : 25**) sont similaire avec les résultats de la (**Figure : 24**) donc les pourcentages des zone d'inhibition reste stable Aprée la gamme de traitement thermique.

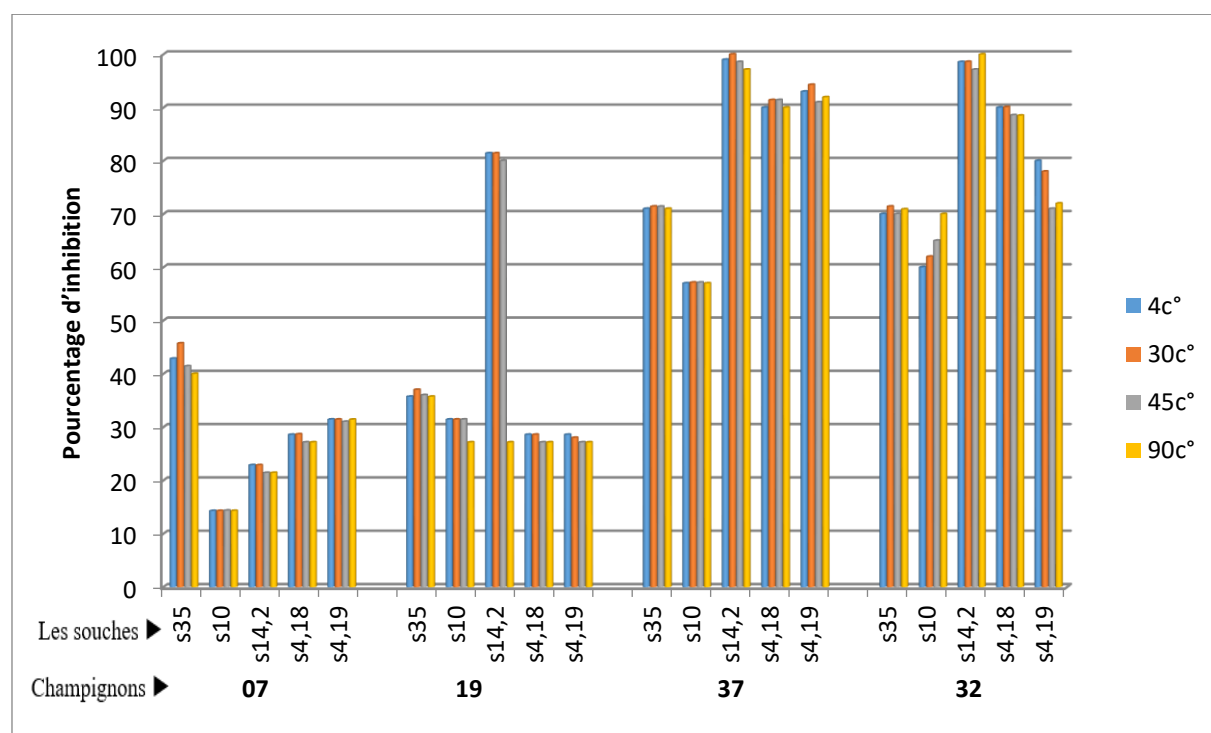


Figure 25: Pourcentage d'inhibition d'*Aalternaria alternata* sp. Par les métabolites traité par déférent la chaleur des lactobacillus plantarum et *Enterococcus faecium*.

4.2. L'effet des enzymes protéolytiques :

Le traitement des substances antifongique a été soumise à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, lysozyme) (Figure : 25). Ces dernières altèrent complètement l'activité antifongique, Ceci indique que la partie biologiquement active de l'inhibiteur est nature protéique. Cette nature suggère que cette substance inhibitrice est considérée comme étant une bactériocine. (Tagg et al., 1976 ; Klaenhammer et al., 1994 ; Zamfir et al., 1999)

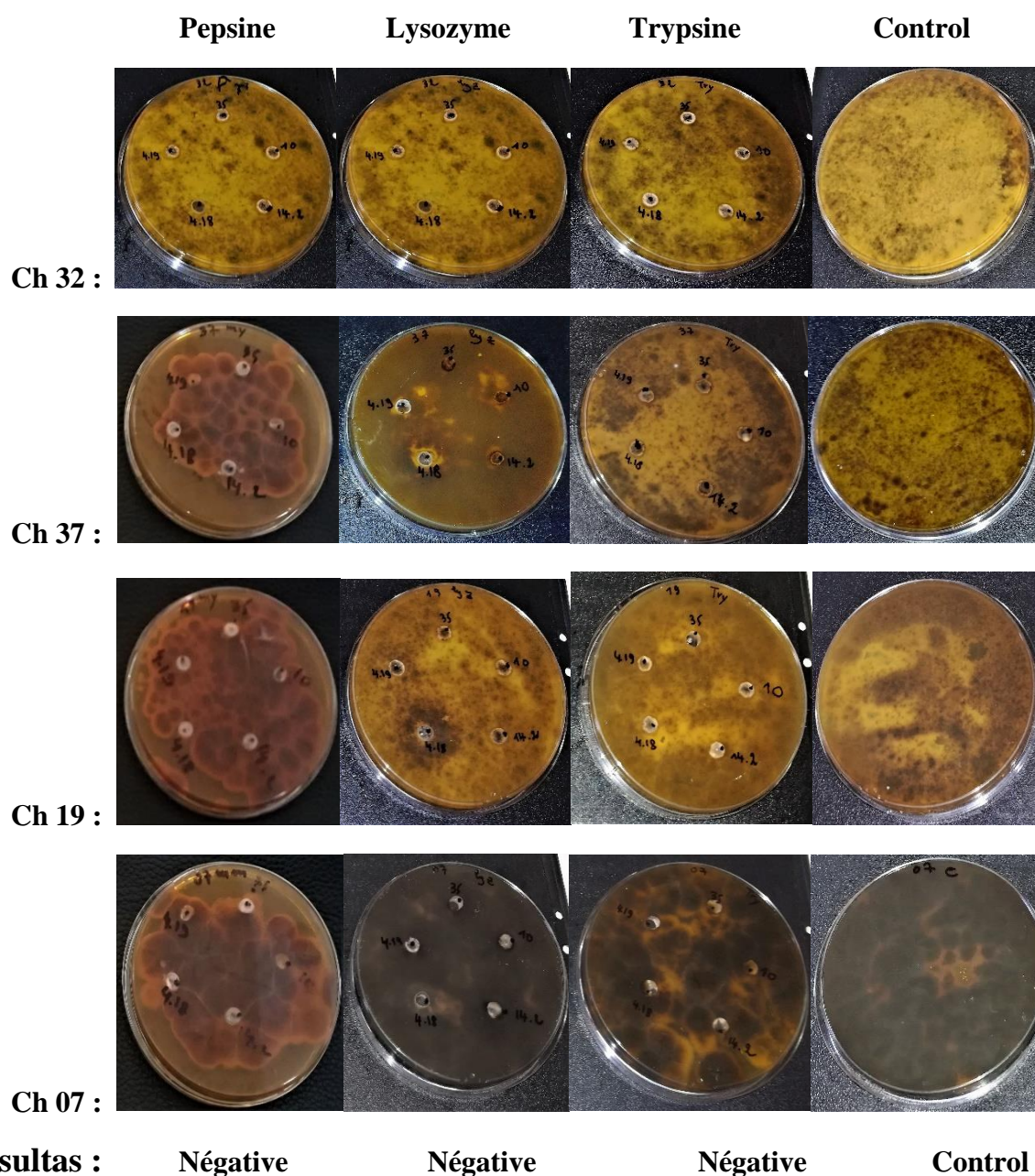


Figure 26 : effet des enzymes protéolytique de l'activité antifongique.

4.3. L'effet du pH :

Un autre paramètre tout autant important pour la production de bactériocines, il s'agit du pH du milieu de culture. (Blom *et al.*, 1997). antibiotiques, qui semblerai bien meilleur à pH neutre (pH = 7), nous avons tenté d'utiliser le milieu MRS tamponnée à pH = 7 (Benmouna *et al.*, 2008).

L'effet inhibiteur a été testé comme pour le reste des paramètres étudiés précédemment, c'est-à-dire par antagonisme différé du surnageant des isolats lactiques, les résultats sont similaire avec (Sabia *et al.*, 2014).

Pour ce qui est du pH, nous avons constaté une meilleure croissance et production à pH 7, ce qui est en accord avec Blom *et al.* (1999) qui ont remarqué une meilleure production dans un milieu de pH 7.

Une inhibition totale a été observée à pH 7 pour toutes les souches et une diminution de l'inhibition dans des valeurs de pH 2, 4 (Figure 26), ceux-ci suggèrent la contribution des bactériocine dans l'activité antifongique parce que leur activité dépend du pH neutre.

Le pH influe sur le métabolisme de *Lb. Plantarum* et *Enterococcus faecium* et *Eterococcus lactis* qui ont montré une production maximale de composés antifongiques lorsqu'elles sont cultivées à pH 7 et une production modéré dans le pH 9 est minimal a pH 2.(Figure 26).

Une grande zone d'inhibition a été observée pour *Enterococcus faecium* 14.2 à pH 7 et 9, le pourcentage d'inhibition par cette souche vis-à-vis les champignons 19/37/32 entre 80 % et 100% pour pH 7 est entre 70% et 80% pour pH 9 et un pourcentage entre 20% et 40% vis-à-vis champignon 07 pour les deux valeurs de pH.

Pour les souches de *lactobacillus plantarum* 4.18 et *Enterococcus faecium* 4.19/35 et *Enterococcus lactis* 10 vis-à-vis le champignon 32 des zones d'inhibition a été observé a un pourcentage entre 70% et 90% à pH 7 et des zones entre 50% et 75% à Ph 9.et vis-à-vis le champignon 37 entre 60 et 100% à pH 7 et 45% à 82% pour pH 9. Et pourcentage faible vis-à-vis les champignons 07 et 19 entre 20% et 40% pour les deux valeurs de pH.

Pour les deux pH 2 et 4 les pourcentages inhibition sont très faible de pourcentage entre 14% et 20% pour tous les souche de *lactobacillus plantarum* et *Eterococcus faecium* due à une faible production de bactériocine a ces pH.

Toutes les souches montrent une forte activité antifongique à pH 7 et 9. Ont indiqué que la souche *Lb. plantarum* et *lactobacillus facium* produit des composés antifongiques dans la gamme de pH plus basique. Les souches perdit son activité antifongique à pH 4 et 2, bien que l'activité est maximale dans ce pH 7 traduit une bonne inhibition.

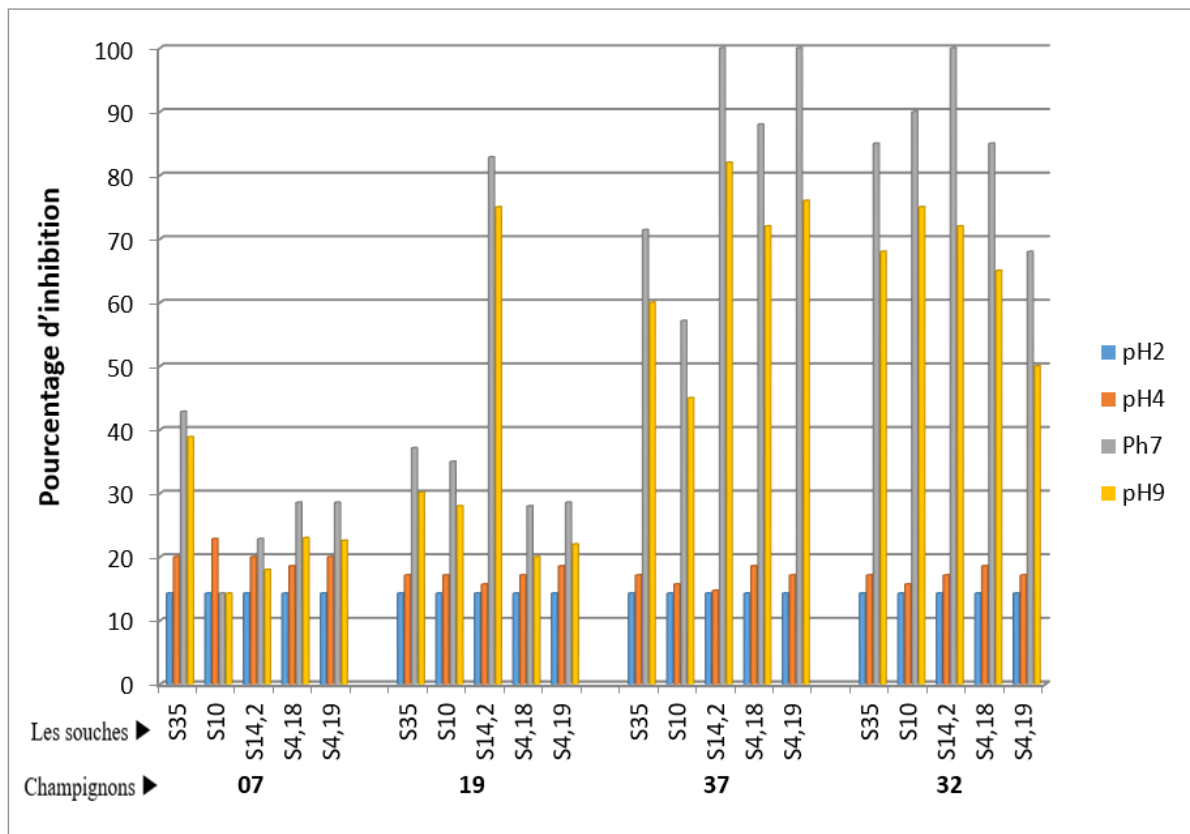


Figure 27 : L'effet du pH de milieu sur les substances antifongiques produites par *Lactobacillus plantarum* et *Eterococcus facium*.

DISCUSSION GÉNÉRALE :

Discussion générale :

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

La sélection effectuée sur un total de 5 souches lactiques isolées du lait cru de chamelle et lait de chèvre et vache a permis d'obtenir une souche lactobacilles appartenant aux espèces *plantarum* (4.18), et 3 souches d'*Eterococcus facium* (35/4.19/14.2), et une souche *Eterococcus lactis* (10), dont les colonies inhibaient des champignons du genre *Alternaria alternata*. Une différence de sensibilité de cible fongique aux différentes souches antifongiques, ces dépendances étaient fort probablement liées à la sensibilité aux métabolites produits par les bactéries lactiques. Les zones d'inhibition sont variables, malgré que quatre souches font parties de la même espèce, il appert que l'activité inhibitrice était souche-dépendante.

L'étude de la cinétique de production des métabolites antifongiques dans le milieu MRS a révélé une production majeure de ces métabolites pendant la phase de croissance exponentielle.

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

Les métabolites antifongiques provoquent des malformations au niveau du mycélium, conidie et conidiophore. Les bactéries lactiques de par leur innocuité, leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes, et plus particulièrement celles du genre *Lactobacillus*, semblent être de bonnes candidates pour la biopréservation des produits alimentaires. L'utilisation des bactéries lactiques comme culture protectrice apparaît comme une solution parfaitement envisageable pour augmenter la DLC et remplacer les conservateurs chimiques dans les produits alimentaires. Le pain et le jus d'abricot, dont la production peut être facilement reproduite en laboratoire, ont été choisis comme modèle d'étude afin de répondre à notre objectif principal qui était d'obtenir une culture protectrice.

Les différences de nutriments disponibles peuvent induire des différences dans la croissance des souches et dans les substances qu'elles produisent, difficile de prédire l'efficacité, au sein d'un produit, d'une souche qui avait présenté des activités antifongiques en milieu de culture. Les souches utilisées dans cette étude nécessitent une période d'incubation pour être capables d'inhiber la croissance fongique, donc pour être plus efficace contre la croissance d'*Alternaria alternata*. Dans les denrées alimentaires, il faut les utiliser avant la contamination parce que, une fois que la moisissure est établie, il est difficile de la contrôler, même à l'aide de bactéries lactiques à caractère antifongique. Selon les travaux de (LAREF Nora., 2013-2014).

CONCLUSION :

Conclusion :

La présente étude a pour objectif de prévenir la croissance d'*Alternaria alternata* par l'utilisation des bactéries lactiques, dont l'activité antibactérienne et l'innocuité sont largement décrites. L'activité antagoniste de quatre souches de *Enterococcus faecium*, et une souche *Lactobacillus plantarum* isolés du lait de chamelle et lait de chèvre et vache vis-à-vis d'*Alternaria alternata*. Par la méthode de confrontation, à démontré une bonne inhibition fongique, ces résultats sont similaires avec celles détectées sur le surnageant selon la méthode des puits. Les substances produites par *Lb. plantarum* (4.18) et *Enterococcus faecium* (35/14.2/4.19) et *Enterococcus lactis* (10), sensible aux enzymes protéolytiques et stables à la température, montrent une forte activité à pH 7 et inhibent les champignons testés.

La germination des conidies est la phase la plus sensible à l'inhibition, en revanche, la croissance mycélienne est la phase la plus difficile à inhiber. Une bonne inhibition fongique a été faite en milieu liquide par rapport au solide, en parallèle, les cinq souches montrent un effet protecteur dans le jus d'abricot, et aucun effet dans le pain, dû à la différence biochimique de la matrice alimentaire. Selon les travaux de (LAREF Nora., 2013-2014).

L'effet inhibiteur des bactéries lactiques est un mécanisme complexe, qui laisse place à d'autres études, afin de comprendre le mécanisme de production et le mode d'action des composés inhibiteurs. Les bactéries lactiques montrent une réelle possibilité d'application pour la biopréservation, il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à décontaminer et de rechercher d'autres genres et espèces des bactéries lactiques à caractère antifongique. Plusieurs lactobacilles ont été jugés capables de lier les mycotoxines, donc il serait intéressant d'étudier l'activité antimycotoxine de nos souches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Agrios, GN. 2005. Plant pathology. 5th Ed. Elsevier, London. 922: 455.

ALOMAR J.. 2007. Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique De LORRAINE.

Amouzou K S., Prevost H., Divies G.R., 1985 - Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by *streptococcus lactic* and *streptococcus thermophilus*. Lait: 65: pp 21-34.

Amsellem, Z. Zidack, NK. Quimby, PC. Gressel, JrJ. 1999. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. Crop prot. 18: 643-649.

Andersen, B. Frisvad, JC. 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. J. Agricul. Food Chem. 52: 7507-7513.

Arrebola, E. Jacobs, R. Korsten, L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB against postharvest fungal pathogens. J Appl Microbiol. 108: 386-395.

Badillet, G. 1991. Les Alternarioses cutanées. Revue générale. J. Mycol. Méd. 118: 59-71.

Badis A., Guetarni D., Kihal M., Boudjemaa M. (2003). « Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races ». In Food and microbiology, 579-588.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R.. 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie* N°23.Pp :30-37.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23:30-37.

Baek E, Kim H, Choi H, Yoon S, Kim J., 2012, Antifungal Activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in Rice Cakes, Journal of Microbiology, 50, 842-848.

Baker, KE. Cook, RJ. 1974. Biological control of plant pathogens, Freeman, San Fransisco.

Barefoot S.F., Klaenhammer T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808- 1815.

BARNETT. H.L, et BARRY .B.,HUNTER.,(1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 209P.

Barrefoot S. F. et Klaenhammer T. R., (1984) Purification and characterization of *lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lacticin B. *Antimicrobiology Agent Chemother*, 26(3).

BASSADAT nabahat, 2014. Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria sp.* responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires, 50.

Basu, PK. 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Can Plant Dis Surv.* 54: 45- 51.

Bayrock D.P, Ingledew W.M., 2004, Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity?, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 362-368.

BEAL C.,MARIN M., FONTAINE E., FONSECA F. et OBERT J. P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Corrieu, G. Et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.* Tec&Doc Lavoisier, Paris, 661-785.

Bekhouche F.. 2006 : Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes (1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase). Thèse de doctorat. Université De Mentouri Constantine.

Berto, P. Belingheri, L. Dehoeter, B. 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology Letters.* 19 (6): 533-536.

Berto, P. Commenil, P. Belingheri, L. Dehoeter, B. 1999. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in infection of cauliflower leaves. *LEMS Microbiology letters.* 180: 183-189.

Bisby, GR. 1939. *Trichoderma viride* Pers. Ex. Fries and notes on *Hypocrea*, *Trans. Br. Mycol.Soc.* 33: 149- 169.

Bjorkroth J.A., Holzapfell W.H. and Dicks L.M.. 2009. Genus *Leuconostoc*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three.* Springer.

Blancard, D. Laterrot, H. Marchoux, G. Candresse, T. 2012. A colour Handbook – Tomato Diseases: identification, biology and control. *Manson Publishing Ltd.* 688 pp.

Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L., and Holo, H. (1999) Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Curr Microbiol.* 39: 43-48.

BOTTON B.; BRETON A. FEVRE M., GAUTHIER S GUX PH., LARPENT J P., REYMOND P., SANGLIER JJ., VAYSSIER Y, et VEAU P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Paris Milan Barcelone Mexico. Deuxième édition. PP .93, 191, 139.

Botton, B. Bretton, A. Fevre, M. Gauthier, S. Guy, Ph. Larpent, JP. Reymond, P. Sanglier, JJ. Vayssier, Y. Veau, P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2eme edition. Paris. 512: 309.

Bourgeoi. etLarpent, J.P. (1996).s, C.MMicrobiologie alimentaire : Aliments fermentes et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.

Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988 - Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane lait : 1: pp 65-84.

Brame. C, Flood, J. 1983. Antagonism of *Aureobasidium pullulans* towards *Alternaria solani*. Transactions of the British Mycological Society. 81 (3): 621-624.

Bush, RK. Portnoy JM. 2001. The role and abandament of fungal allergens in allergic diseases. J.Allergy Clin. Immunol. 107: 430- 440.

Carlos, M. Ochoa. 1991. The potatoes of South America. Cambridge University Press. .(0521380243 ISBN)182pp.

Carr F.J, Chill D, Maida N., 2002, The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, Critical Reviews in Microbiology, 28, 281-370.

Chaerani, R. Voorrips, RE. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance (review). J Gen Plant Pathol. 72: 335-347.

Chalutz, E. Ben-Arie, R. Droby, S. Cohen, L. Weiss, B. Wilson, CL. 1988. Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit. Phytoparasitica. 16: 69-75.Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci Biotechnol Biochem.*71: 1984-1992.

Chattopadhyay, SK. Nandi, B. 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryza* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporius* (Krasil nikov) Waksman. Journal of Plant and Soil. (69):171-175.

Choudhary, DK. Johri, BN. 2009. Interactions on *Bacillus spp.* and plants- with special reference to induced systemic resistance in plant. Microbiol Res. 164: 493-513.

CHOUVENC P., VESSOT S. ,ANDRIEU J. et VACUS P. (2004). Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. Drying. Technol., 22, 1577-1601.

Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Hernandez, P. E., and Nes, I. F. (2000) Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol.* **182**: 6806-6814.

Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., and Håvarstein, L. S. (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol.* **180**: 1988-1994

Collins E.B, Hardt P., 1980, Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Dairy Science*, 63, 830-832.

Corrieu G., Luquet F M., 2008 - bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France :pp 472 -676.

Cramer, RA. Lawrence, CB. 2003. Cloning of a gene encoding an *Alt a 1* isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2361-2364.

Criado, R., Diep, D. B., Aakra, A., Gutierrez, J., Nes, I. F., Hernandez, P. E., and Cintas, L. M. (2006) Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 6653-6666.

D'Amato, G. Spieksma, FThM. 1995. Aerobiologic and clinical aspects of mold allergy in

Dalié D.K.D, Deschamps A.M, Atanasova-Penichon V., 2010a, Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf To Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth, *Journal of Food Protection*, 73, 1129-1137.

Dalié D.K.D, Deschamps A.M, Atanasova-Penichon V., 2010a, Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf To Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth, *Journal of Food Protection*, 73, 1129-1137.

DE BEER T.R.M., BAEYENS W. R.G., OUYANG J., VERVAET C. et REMON J.P. (2006). Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. *The Analyst.* 131, 1137-1144.

De Roissart H. et Luquet F. M. 1994 – Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques, 1, Uriage, Loriga, 605 p.

De Vuyst, L. and Vandamme E J. 1994 - Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* : properties, biosynthesis, fermentation and application. In: De Vuyst L, Vandamme E J. , editors; De Vuyst L, Vandamme E J. , editors. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Glasgow, United Kingdom: Blackie A and P. pp. 151–221.

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.

Delavenne E, Mounier J, D'eniél F, Barbier G, Le Blay G., 2012, Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period, International Journal of Food Microbiology, 155, 185-190.

Delavenne E, Mounier J, D'eniél F, Barbier G, Le Blay G., 2012, Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period, International Journal of Food Microbiology, 155, 185-190.

Delavenne E., 2012, Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus, Thèse Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D.. 1994. Caractéristiques générale des bactéries lactiques in « Bacterielactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

Delorme C., 2008: Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. International Journal of Food Microbiology 126: 274–277.

Desmazeaud M. J. 1983 - L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 63, 629-630: 267 - 316.

DeVos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whiteman W. B.. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.

Djossou O, Perraud-Gaime I, Lakhel Mirleau F, Rodriguez-Serrano G, Karou G, Niamke S, Ouzari I, Boudabous A, Roussos S., 2011, Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. As potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*, *Anaerobe*, 17, 267-277.

Dortu C. et Thonart P.. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(1) : 143-154.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13:143-154

- Drider D., Prevost H., 2009** - Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris :pp 381- 427.
- Drider D., Prevost H., 2009** - Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris :pp 381- 427.
- Dutkiewicz, J.** 1997. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4: 11-16.
- Dworkin I. and Gibson G.. 2006.** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 1417–1431.
- El-Farnawany, MA.** 2006. Effect of seed treatment with *Trichoderma harzianum* on reducing tomato early blight incidence. *Assiut-Journal-of-Agricultural-Sciences.* 37 (1): 201-216.
- Elliott, JA.** 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *Amer. J. of Bot.* 4: 439- 476.
- Ellis MB, Gibson, IAS.** 1975. *Alternaria solani* no. 45 set 48. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.
- Ellis, M. B.** 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Kew. 608pp.
- Emeryk, A. Chojna, A. Bartkowiec, k. Emeryk, M. Postępski, J.** 2004. Prevalance of asthma and some respiratory symptoms in the years 1995 and 2001 in schoolchildren from rural regions of Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11: 63- 66.
- Erikson, O E. Hawksworth, DJ.** 1991. Outline of the ascomycetes. *Syst. Ascomycet.* 9: 39- 271.
- Esquivel, EA.** 1984. *Pleospora solani* sp. nov, teleomorphosis of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. *Phytopathology.* 74:1014. *Europe. Allergy.* 50: 870-877.
- Evans, KJ. Nyquist, WE. Latin, RX.** 1992. A model based on temperature and leaf wetness duration for establishment of *Alternaria* leaf blight of muskmelon. *Phytopathology.* 82: 890- 895.
- Facklam R.. 2002.** What Happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews.* 15: 613-630.
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L., and Jiménez-Díaz, R. (1998)** Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4883-4890.
- Fraser, JT.** 2002. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). Thesis. Master of Science. Cornell University. 72pp.

- Fries, E M. 1832. Systema mycologicum.. E. Moritz, Greifswald. Vol. 3: 261- 524.
- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.*73: 2871-2877.
- FULLER R.(1998). Probiotics in man and animals.J.Appl.Microbiol.66:365-378.
- Gajbhiye M, Prakash D, Jagdale S, Ahiwale S, Patil N, Kapadnis B., 2012, Pomegranate Borne Fungicidal Lactic Acid Bacteria and their Biodiversity, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 82, 413-419.
- Ganie, SA. Ghani, MY. Nissar, Q. Jabeen, N. Anjum, Q. Ahanger, Ayaz, AF. 2013. Status and symptomatology of early blight (*Alternaria solani*) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Kashmir valley. *African Journal of Agricultural Research.* 8 (41): 5104-5115.
- Gerbaldo G.A, Barberisa C, Pascuala L, Dalceroa A, Barberisa L., 2012, Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiology Letter*, 332, 27-33.
- Gerez C.L, Torino M.I, Rollan G, De Valdez G.F., 2009, Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, *Food Control*, 20, 144-148.
- Gould G.W., 2000, Preservation: past, present and future, *British Medical Bulletin*, 56, 84-96.
- Grogan, RG. Kimble, KA. Misaghi, I. 1975. A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology.* 65: 880-886.
- Grogan, RG. Kimble, KA. Misaghi, I. 1975. A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology.* 65: 880-886.
- GUARNER F., KHAN A.G., GARISCH J., ELIAKIM R., GANGL A., THOMSON A., KRABSHUIS J. et LE MAIR T. (2008). Recommendation que: Probiotiques et Prébiotiques. WGO Practice Guidelines. 3.
- Guillo N., 1958, Élaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*, *Annales de l'institut Pasteur*, 95, 194-207.
- Guiraud J.P. et Galzy P.. 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. P 239.
- Haddie J.M.. 1986. Other streptococci. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.

- Hadef S.. 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Harold Eddleman, Ph. D (February 1998).** "Making Bacteria Media from Potato". Indiana Biolab. disknet.com. Retrieved 2011-03-04.
- Hassan A.N. and Frank J.F.. 2001.** Starter Cultures and their use. *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- Hassan Y.I, Bullerman L.B., 2008,** Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 112-115.
- Hathout, TA.** 1997. Causes of blackening of infected spots of tomato fruits. *Egyptian Journal of Physiological Sciences*. 17 (2): 351-360.
- Hatzipapas, P. Kalosaka, K. Dara, A. Christias, C.** 2002. Spore germination and appressorium formation in the entomophagic *Alternaria alternata*. *Mycological research*. 106: 1349-1359.
- Hawkes, JG.** 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources., Londres, Belhaven Press. 259pp.
- Hawkes, JG.** 1994. Potato genetics. International, Wallingford, Origins of cultivated potatoes and species relationships. (Eds. Bradshaw, J.E and Mackay, G.R.). CAB.
- Haydersah J.. 2010.** Étude de la fermentation lactique de plantes amyliacées tropicales *Potentiel des bacteries lactiques amylolytiques*. Thèse de doctorat .Université des Antilles et de la Guyane.
- Hirsch P.R., 1979,** Plasmid-determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum*, *Journal of General Microbiology*, 113, 219-228.
- Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. and Caubet R.. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.
- Hogg T.. 2005.** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd*. 188-190.
- Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Blotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guedon E., Monnet V., Renault P. and Kleerebezem M.. 2005** . new insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 29 :435-463.
- Holzappel W.H., Franz C.M., Ludwig W. and Dicks L.M.T.. 2009.** Genus *Pediococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes*. Second Edition. Volume Three. Springer.

Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22: 401-407.

Imbert M., Bondaeu R., 1998 - On the iron requirement of *Lactobacilli* grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 37: pp 64-66.

Isshiki, A. Akimitsu, K. Yamamoto, M. Yamamoto, H. 2001. Endopolygalacturonase is essential for citrus Black Rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *The American Phytopathological Society*. 14: 749-757.

Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007)

Jack, R. W., Bierbaum, G., and Sahl, H.-G. (1998) Lantibiotics and Related Peptides. In: Jack, R. W., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (Eds). *Lantibiotics and Related Peptides*. Springer Verlag, Georgetown, USA. Pp.

Jiang, Y.M. Chen, F. Liu, S.X. 1997. A preliminary study on the biological control of litchi fruit. *Journal of fruit scienc.* 14 (3): 185-186.

Jiang, Y.M. Zhu, X.R. Li, Y.B. 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensmittel Wissenschaft Technology*. 34 (7): 430- 436.

Joly, P. 1964. Le genre *Alternaria*. *Encyclopédie Mycologique*, Ed. J. P. Lechevalier. Paris.

Jourdan, E. Henry, G. Duby, F. Dommes, J. Barthelemy, LP. Thonart, P. Ongena, M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plants cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe interact.* 22: 456- 468.

Keissler, K. von. 1912. Zur Kenntnis der Pilzflora Krains. *Beih. Bot. Centralbl.* 29: 395- 440.

Klaenhammer T. R., Ahn C. and Muriana P. M. 1994 - Lactacin F, a small hydrophobic heat-stable bacteriocin from *Lactobacillus johnsonii*, p. 377–396. In De Vuyst L. and Vandamme E. J. (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Chapman and Hall, London.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Bioch.* 70:337-349.

König H. and Fröhlich J.. 2009. Lactic Acid Bacteria, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Laitila A, Alakomi H.L, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Haikara A., 2002, Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 566-576.

LANGELLA P., NOUAILLE S., COMMISSAIRE J., BOLOTINE A., GRUSS A. et LE LOIR Y. (2001). Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 19-28. Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36: 1-29.

Laref Nora., 2014, L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*aspergillus* sp.

Larpen-Gourgaud Monique, Michaux Odile, Larpen J.P, Desmasure Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C. et Tailliez Patrick., 1997. Les ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpen J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 199-255.

Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., 1977 - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol 42: pp123-133.

Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., 1977 - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol 42: pp123-133.

Leiminger, J. Bahnweg, G. Hausladen, H. 2010. Population genetics – consequences on early blight disease. Twelfth Euro Blight workshop Arras (France), *PPO-Special Report*. 14: 171-178.

Lenoir J., Hermier J., Weber F., 1992 - Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.

Lepoivre, P. 2003. Phytopathologie. De Boeck et Lancier, Bruxelles. 427: 320.

Letrot C., Juillard V., 2001 - Development of a minimal chemically defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. APPL. Microbiol.* 91: pp 1023-1029.

Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.

Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.

Lin, M.D. Morassin, P. Recco. 1999. Actualités sur *Alternaria*: écologie, *Revue Française d'allergologie*. 349- 355.

Lin, M.D. Morassin, P. Recco. 1999. Actualités sur *Alternaria*: écologie, *Revue Française d'allergologie*. 349- 355.

Logrieco, A. Moretti, A. Solfrizzo, M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*. 2 (2): 129-140.

Lopes, CA. Boiteux, LS. 1994. Leaf spot and stem blight of sweet potato caused by *Alternaria bataticola*; a new record to South America. *Plant disease*. 78: 1107-1109.

Lourent Federighi M., Jouve J L., 1998 - Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p.

Luquet F M., 1986 - Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343-442.

Luquet F M., 1986 - Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343-442.

Magnusson J, Schnürer J., 2001, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5.

Magnusson J, Schnürer J., 2001, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5.

Marth E.H, Hussong R.V., 1963, Effect of skim milks cultured with different strains of *Leuconostoc citrovorum* on growth of some bacteria and yeasts, 46, 1033-1037.

Martin-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J. J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M., and Martinez-Bueno, M. (2006) Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol.*72: 4245-4249.

MÄYRÄ-MÄKINEN A. et BIGRET. (1998). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology et functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102.

MÄYRÄ-MÄKINEN A. et BIGRET. (1998). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology et functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102.

Messiaen, CM. Blancard, D. Rouxel, F. Lafon, R. 1991. Les maladies des plantes maraichères, INRA Paris. 552pp.

Mitakakis, T. Ong, EK. Stevens, A. Guest, D. Knox, RB. 1997. Incidence of *Cladosporium*, *Alternaria* and total fungal spores in the atmosphere of Melbourne (Australia) over 3 years. *Aerobiologia*. 13: 83- 90.

Muhialdin B.J, Hassan Z, Sadon S.K., 2011, Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on selected foods, *Journal of Food Science*, 76, 493-499.

- Muhialdin B.J, Hassan Z., 2011**, Screening of Lactic Acid Bacteria for Antifungal Activity against *Aspergillus oryzae*, American Journal of Applied Sciences 8, 447-451.
- Nakata H, Hasegawa H, Sakurai H, Tamura M., 2010**, Distinctive Flavor and Strong Antifungal Activity in a Sourdough Bread Made Using Unique Lactic Acid Bacteria Obtained from a Sugar Factory, Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 57, 85-90.
- Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P., 2011**, Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food, Journal of Food Science, 76, 305-311.
- Ndagano D., 2011**, Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires fermentés et caractérisation de leurs métabolites inhibiteurs, Ph.D, Thèse, Université de Liège.
- Neergaard, P.** 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*: taxonomy, parasitism, economic significance. Oxford University Press, London. 260 -287.
- Neergaard, P.** 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*: taxonomy, parasitism, economic significance. Oxford University Press, London. 260 -287.
- Nees, Von Esenbeck, GG.** 1817. System der Pilze Urid Schwamme, Wurzburg. 234 pp.
- Nissen-Meyer, (2009) J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E.** Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.10*: 19-37.
- Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2010)** Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.2*: 52-60.
- Novel, G.. 1993.** Les bactéries lactiques. Microbiologie industrielle, les Micro-organismes d'interet industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.
- Ongena, M. Jacques, P.** 2008. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16: 115- 125.
- Ongena, M. Jourdan, E. Adam, A. Paquot, M. Brans, A. Joris, B. Arpigny, JL. Thonart, P.** 2007. Surfacing and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol. 9: 1084- 1090.
- Osiru, M.** 2008. Distribution, variability and pathogenicity of *Alternaria* leaf petiole and stem. blight disease of sweetpota to in Uganda. PhD. Thesis. Makerere University, Kampala. 33-61.

- Otani, H. Kohnobe, A. Kodama, M. Kohmoto, K.** 1998. Involvement of host factors in the production of a protein host-specific toxin produced by *Alternaria brassicicola*. *Molecular genetics of host specific toxins in plant disease*. 13: 63-69.
- Pandey A., Bringel F., Meyer J M., 1994** - Iron requirement and 5 earchforsiderophoresincactic acid bacteria. *Apple. Microbiol. Biotechnol*: 40: pp 735-739.
- Patterson, C. L.** 1991. Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight of tomato. *Plant Disease*. 75: 274-278.
- PEGG D.E. (2002).** The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, 20, 513.
- Penaud S.. 2006.** Analyse de la sequence genomique et etude de l'adaptation l'acidite de *Lb.delbrueckii*sp. *Bulgaricus* ATCC 11842. Thèse de Doctorat. Istitut National Agronomique de Paris-Grignon.
- Peralta, IE. Knapp, S. Spooner, DM.** 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Report of the tomato genetics cooperative*. 56: 5-12.
- Pérez-Gacia, A. Romeo, D. de Vicente, A.** 2011. Plant protection by microorganisms : biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*. 22: 187-193.
- Pilet M.F., Magras C. et Federighi M.. 1998.** Bactéries lactiques. *In : Manuel de bactériologie alimentaire* (Sutra L., Feederighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.
- Pringsulaka O., Thonggam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. and Rangsiruji A.. 2011.** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai-fermented meat and fish products. *Food Control* ,23: 547-551.
- Pusey, PL. Wilson, CL.** (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot of bacillus subtilis. *Plant diseases*. 68: 753- 756.
- Qin, GZ. Tian, SP.** 2004. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low doses of fungicides under different storage conditions. *Plant Diseases*. 88 (5): 497- 501.
- Qin, GZ. Tian, SP. Xu, Y.** 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonists yeasts in different storage conditions. *Postharvest biology and technology*. 31 (1): 51-58.
- Roberts, RG. Reymond, ST. Andersen, B.** 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*. 104 (2): 151-160.

- RODRIGUEZ J. M., MARTINEZ M. I., HORN N. et DODD H. M. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80, 101-116.
- Romeo, D. de Vincente, A. Racotoaly, RH. Dufour, SE. Veenig, JW. 2007.** The iturin and fungicin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant-Microbe interact.* 20: 430-440.
- Rosas, I. Escamilla, B. Calderón, C. Mosiño, P. 1990.** The daily variations of airborne fungal spores in Mexico City. *Aerobiologia*, 6: 153-158.
- Rotem, J. 1994.** The genus *Alternaria*, biology and pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota. 326pp.
- Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D., 2008,** Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923.
- RUAS-MADIEDO P., HUGENHOLTZ J. et ZOON P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International*.
- Ryan L, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P, Arendt E., 2011,** *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products, *Journal of Food Microbiology*, 146, 276-283.
- Sabriye, Y. Yanar, Y. Karaman, I. 2011.** Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *African journal of biotechnology*. 10 (9): 1573- 1577.
- Saccardo, PA. 1886.** Hyphomycetae. In: *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*. Pavia, Italy. 4: 807pp.
- Säde E.. 2011. *Leuconostoc* Spoilage of refrigerated, packaged foods.** doctoral thesis. University of Helsinki Finland.
- Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. and Benno Y.. 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. *In* : *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 515-530.
- Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. and Benno Y.. 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. *In* : *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 515-530.
- Salminen S., Wright A.V. and Ouwehand A.C.. 2004.** *Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects* Third edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.

- Salminen S., Wright A.V. and Ouwehand A.C.. 2004.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Third edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
- Sandrock, RW. Vanetten, HD.** 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology*. 88: 137-143.
- Sathe S.J, Nawani N.N, Dhakephalkar P.K, Kapadnis B.P., 2007,** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622-2628.
- Sathe S.J, Nawani N.N, Dhakephalkar P.K, Kapadnis B.P., 2007,** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622-2628.
- Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*. 46 : 201-203.
- Sharma, RR. Dinesh, S. Rajbir, S.** 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*. 50: 205-221.
- Shekh R, Upadhyay K, Singh S.M, Roy U., 2009,** Inhibition of *Candida albicans* and two selected Gram-negative pathogens by Polar *Enterococcus faecalis* and *Carnobacterium* sp., *Research Journal of Microbiology*, 4, 138-142.
- Sherf, AF. MacNab, AA.** 1986. Vegetable diseases and their control. Wiley, New York.
- Sherf, AF. MacNab, AA.** 1986. Vegetable diseases and their control. Wiley, New York.
- Simmons, EG.** 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*. 59: 67-92.
- Simmons, EG.** 1986. *Alternaria* terms and variations. (22- 26). *Mycotaxon*. (*Pleospora/ Stemphylium* and *Lewia/Alternaria*). 25: 287-308.
- Simmons, EG.** 1999. *Alternaria* themes and variations (236-243). Host-specific toxin producers. *Mycotaxon*. 70: 325- 69.
- Simmons, EG.** 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon*. 75: 1-115.
- Simmons, EG.** 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBSFungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- Simmons, EG.** 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.

Singh, RS. 1987. Diseases of Vegetable Crops. Oxford and IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, Bombay, Calcutta. 419pp.

Singleton, P. 1999. Bactériologie. 4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L., 2003, Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, Applied and Environmental Microbiology, 69, 7554-7557.

Sjögren J., 2005, Bioassay-guided isolation and characterisation of antifungal metabolites, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Stiles J, Penkar S, Plockova M, Chumchalova J, Bullerman L.B., 2002, Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*, Journal of Food Protection, 65, 1188-1191

Stiles M E. and Holzapfel W H., 1997 - Lactic acid bacteria of foods and their current. Taxonomy. International. Journal of Food. Microbiology: 36: pp1-29.

Stiles M.E., 1996, Biopreservation by lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek, 70, 331-345.

Strandberg, JO. 1992. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management: In: Chelkowski J, Visconti A (eds) *Alternaria* biology, plant disease and metabolites. Elsevier, Amsterdam. 175- 208.

STREIT F. (2008). influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* cfl1. Thèse pour obtenir le grade de docteur. L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech). Spécialité : génie microbiologique. 226p.

Streit F.. 2008. Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. Thèse de Doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Tagg J. R., Dajani A. S. and Wannamaker L. W. 1976 – Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 40, 3: 722 – 756.

Tailliez P., 2004, Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine, Antibiotiques, 6, 35-41.

TAMIME A. Y. et ROBINSON R. K. (1999). Preservation and production of starter cultures. In Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. (ed.). *Yoghurt: Science and Technology*. Woodhead publishing limited, Cambridge, England, 486-514.

Tamime A.Y.. 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3^e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

- TANG X. et PIKAL MJ. (2004).** Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice, *Pharm. Res.* 21, 191-200.
- Taralova, EH. Schlecht, J. Kobus, B. Barry, MP.** 2011. Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal pathology.* 115: 1163-1173.
- Tendulkar, SR. Saikumari, YK. Patel, V. Raghotama, S. Munshi, TK. Balaram, P. Chatto, BB.** 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J App Microbiol.* 103: 2331-2339.
- Teuber M. and Geis A.. 2006.** The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. The Prokaryotes. Vol 4. Springer, pp 4:205-207.
- Teuber Michael, Geis Arnold, 2006.** The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes*4: 205-228.
- Tian, SP. Qin, GZ. Xu, Y.** 2005. Synergistic effects of combining biocontrol agents with silicon against postharvest diseases of Jujube fruit. *Journal of Food protection.* 68 (3): 544- 550.
- Trail, F. Köller, W.** 1993. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 42: 205-220.
- Utkhede, RS. Sholberg, PL.** 1986. *In vitro* inhibition of plant pathogens: *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* *in vivo* control of two postharvest cherry diseases. *Canadian Journal of Microbiology.* 32: 963-967.
- Vaillancourt K., Moineau S., Frenette M., Lessard C. and Vadeboncoeur C., 2002** -Galactose and Lactose Genes from the Galactose-Positive Bacterium *Streptococcus salivarius* and the Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization. Sequence. Transcription. and Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology:* 184: pp 785-793.
- Valerio F, Favilla M, DeBellis P, Sisto A, De Candia S, Lavermicocca P., 2009,** Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, *Systematic and Applied Microbiology,* 32, 438-448.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K. and Swings J.. 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 : 407
- Verma, M. Brar, SK. Tyagi, RD. Surampalli, RY. Valéro, JR.** 2007. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical engineering.* 37: 1-20.

Vloutoglou, I. Kalogerakis, SN. 2000. Effects of inoculum concentrations, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. *Plant Pathol.* 49: 339-345.

Wehmeyer, L E. 1961. A world monograph of the genus pleospora and its segregates. University of Michigan Press. Ann Arbor. 451pp.

Wiltshire, SP. 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Microsporium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 18: 135-160.

Wood BJ B. et Holzapfel W H (éditeur), 1995 - The Lactic acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria 2nd Ed, Blackie Academic and Professional London: 2: pp 40-90.

Yao, C. Köller, W. 1995. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic stages of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and molecular Plant pathology.* 8: 122- 130.

Yedidia, I. Benchamou, N. Kapulnik, Y. Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant physiol. Biochem.* 38: 863- 873.

Yifei, W. Yihong, B. Danhong, S. Wu, F. Ting, Y. Jia, W. Xiao, DZ. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman. *International journal of food microbiology.* 123: 234- 239.

Zamfir M., Callewaert R., Cornea P. C., Savu L, Vatafu I. and De Vuyst L. 1999 - Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*,87: 923 - 931.

Zarour K.. 2010. Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université D'Oran Es-Senia.

Zhang H. et Cai Y.. 2014. Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. Springer Dordrecht Heidelberg New York London P: 535.

ANNEXES

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

| | |
|------------------------------|---------|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande | 10g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Glucose | 20g |
| Tween 80..... | 1 ml |
| Phosphate dipotassique | 2g |
| Acétate de sodium..... | 5g |
| Citrate de sodium | 2g |
| Sulfate de magnésium | 0.2g |
| Sulfate de manganèse | 0.05g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH = 6.5.

Autoclavage : 120°C pendant 20 min.

Milieu de culture MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

| | |
|------------------------------|-------|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande | 10g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Glucose | 20g |
| Tween 80..... | 1 ml |
| Phosphate dipotassique | 2g |
| Acétate de sodium..... | 5g |
| Citrate de sodium | 2g |
| Sulfate de magnésium | 0.2g |
| Sulfate de manganèse | 0.05g |

Eau distillée..... 1000 ml
 Agar15

pH = 6.5.
 Autoclavage : 120°C pendant 20 min.

PDA : (potato dextrose agar) :

Glucose.....;.....20g
 Agar.....20g

L'extrait de 200 gramme de pomme de terre.

Ph = 07

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min

Préparation des enzymes protéolytiques :

L'effet des enzymes protéolytiques a été déterminé selon la méthode décrite par Hirsch (1979), 10 µl de l'enzyme [chymotrypsine, pepsine, lysozyme (1 mg/ml, préparé dans 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)] tous les enzymes ont été dissoute dans la solution tampon, elles ont ajoutées au surnageant brut actif.

0.1 ml de la suspension monosporale (10³ spores/ml) sont ensuite versés sur la boîte. Les zones d'inhibition ont été évaluées après trois jours d'incubation à 30°C dans les boîtes traitées par les enzymes et une boîte non traitée.

Code des souches lactiques :

| Les souches | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Eterococcus lactis</i> | <i>Eterococcus facium</i> |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Code | 4.18 | 10 | 14.2/4.19/35 |