

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Présenté par

M^{lle} MANSOURI WAFFA

M^{lle} MALKI SARRA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Fondamentale

THÈME

Etudes de l'activité antifongique des Bactéries lactiques vis-à-vis
des champignons phytopatogènes d'*Alternaria.sp.*

Soutenue le ..09/2020

DEVANT LE JURY

Président :	Mr. CHERIGUENE Abderrahim	Prof	U. Mostaganem
Encadreur :	Mr. ZABOURI Younes	MAA	U. Mostaganem
Examineur :	Mme. CHOUGRANI Fadela	Prof	U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie
Université de Mostaganem*

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

*Nous exprimons notre profonde gratitude tout d'abord au bon Dieu
le*

*Miséricordieux de nous avoir donné le courage, la volonté et la
force pour réaliser ce travail.*

Nous tenons à remercier profondément notre encadreur

Mr ZABOURI Younes

*Enseignant à l'université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis dont
les directives, Les conseils et les remarques attentionnées qui nous
ont guidés tout au long de notre travail et qui nous ont permis de
le mener à bien.*

Nous lui exprimons toute notre gratitude.

Nous adressons d'autre part nos remerciements au

Pr CHERIGUENE Abderrahim

*Professeur à l'université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis
d'avoir accepté de présider ce travail, nous lui exprimons notre
profonde gratitude*

Nous tenons également à remercier

Pr CHOUGRANI Fadela

*Professeur à l'université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis
d'avoir accepté de juger ce travail*

A vous tous, un grand merci

Dédicace

C'est avec une grande joie, que j'exprime ma gratitude et mes sentiments les plus nobles en dédiant ce travail à :

Mes très chers parents pour le soutien, ma grande famille, mon frère Mohammed,

Mes sœurs Siham, Mimi, Manel, et ma source de bonheur Ikram.

Tous mes amis et mes proches en particule ma chère khadija, mes collègues de la promotion Microbiologie fondamentale 2019/2020,

A mon binôme Waffa

Tous ceux qui aidé à réaliser ce travail.

Sarra

Dédicace

Je remercie ALLAH qui m'a donné la santé, la patience et la volonté pour arriver à ce stade et réaliser ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère « Zohra » et à mon père « NOUREDDINE » pour leur confiance, encouragement et de leur sacrifice durant toute ma vie. Je souhaite que ce travail soit le fruit de leurs efforts...

A mon cher frère : LAKHDER YASINE, je vous souhaite une longue vie et une bonne santé.

A mes chères sœurs : FATIMA et MOUNIRA.

A toute la famille : MANSOURI.

A tous mes amis qui ont rendu ma vie agréable et pleine de bons souvenirs ZINEB, FATIMA ZOHRA, WARDA et bien sur mon binôme SARRA.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

A Toute la promo de Microbiologie Fondamentale 2019-2020.

Waffa

Table de matière

<i>Remerciements</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>Dédicace</i>	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Résumé.....	
Introduction.....	1
Chapitre 1 :.....	3
Partie bibliographique.....	3
I. Le parasite	3
I.1 Généralité sur le genre <i>Alternaria</i> :.....	3
I.2 Classification du genre <i>Alternaria</i> :.....	4
I.3 Caractéristiques distinctives :.....	4
I.4 Systématique du genre <i>Alternaria</i> :.....	5
II. La plante hôte :.....	5
II.1 La tomate :.....	5
II.2 La carotte :.....	6
II.3 <i>Alternaria</i> pathogène des tomates :.....	6
II.3.1 Symptomatologie :.....	6
II.3.2 Sur feuilles :.....	6
II.3.3 Sur tiges et collets :.....	7
II.3.4 Sur fruits et tubercules :.....	8
II.4 <i>Alternaria</i> pathogène des carottes :.....	9
II.4.1 Symptomologie de la maladie :.....	9
II.5 Cycle infectieux :.....	10
II.5.1 Conservation, sources d'inoculum :.....	10
II.5.2 Pénétration et invasion :.....	11
II.5.3 Sporulation et dissémination :.....	11
II.6 Méthodes de lutte contre <i>Alternaria</i> :.....	12
II.6.1 La lutte biologique :.....	12
III. Les bactéries lactiques	14
III.1 Généralités :.....	14
III.2 Caractéristiques générales des bactéries lactiques :.....	15

III.3	Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :.....	15
III.3.1	Le genre <i>Lactobacillus</i> :.....	15
III.3.2	Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i> et <i>Fructobacillus</i> :	17
III.3.3	Les genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> :.....	18
III.4	Utilisation et application :	20
III.5	Interaction avec d'autres micro-organismes :.....	21
III.6	Activité antifongique.....	21
III.6.1	Les lactobacilles et l'inhibition fongique :	21
III.6.2	Les substances antifongiques :	22
III.6.3	Les acides organiques :.....	23
III.6.4	Les bactériocines :.....	23
III.6.5	Bactériocines produites par des bactéries du genre <i>Enterococcus</i> :	24
III.6.6	Bactériocines produites par des bactéries du genre <i>Lactobacillus</i> :	24
III.7	Méthodes de conservation :.....	25
III.7.1	Méthodes de conservation des souches lactiques :.....	25
III.7.2	Congélation :	25
III.7.3	Lyophilisation :.....	25
Chapitre II:	27
Matériels et Méthodes.	27
I. Objectif :	28
II. Matériels :	28
II.1	Matériel biologique :.....	28
II.1.1	Les bactéries lactiques :.....	28
II.1.2	Les souches fongiques :.....	28
II.1.3	Milieux de culture :	31
III. Méthodes :	31
III.1	Les souches fongiques :.....	31
III.1.1	L'isolement de l'agent pathogène :	31
III.1.2	Purification des souches :.....	33
III.1.3	Conservation des souches fongique :	37
III.2	Les bactéries lactiques :.....	37
III.2.1	Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches et leurs appartenances au groupe lactique :	37
III.2.2	Confirmation des bactéries lactiques :.....	37
III.2.3	Conservation des bactéries lactiques :.....	39
III.3	La recherche de l'activité antifongique :.....	41

III.3.1	Test qualitatif : Méthode de confrontation :	41
III.3.2	Test qualitatif : Méthode de confrontation directe :	41
III.3.3	Test qualitatif : Méthode de confrontation à distance :	41
III.3.4	Test qualitatif : Méthode des stries :	42
III.3.5	Test quantitatif : Méthode des puits :	42
Chapitre III :		28
Résultats et discussion		28
I. Les souches fongiques :		44
I.1	Isolement et purification d' <i>Alternaria sp</i> :	44
I.1.1	Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques des isolats d' <i>Alternaria sp</i> :	44
I.1.2	Evaluation des caractères morphologiques microscopiques des isolats d' <i>Alternaria sp</i> :	48
I.2	La culture monospore :	49
II. Les bactéries lactiques :		49
II.1	Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :	49
II.1.1	Critères morphologiques :	49
II.1.2	Tests physiologiques :	50
II.2	La recherche de l'activité antifongique :	50
II.2.1	Méthode de confrontation :	51
III. Discussion générale :		52
Annexes		57

Liste des abréviations

PDA.....	potato desxtrose agar.
Min.....	minute.
C.....	Control.
LAB.....	bactéries lactique.
Fig.....	Figure.
Tab.....	Tableau.
Leu.....	<i>Leuconostoc</i> .
Strep.....	<i>Streptococcus</i> .
Lacto.....	<i>Lactococcus</i> .
Ch.....	Champignons.
S.....	Souche.
LB.....	<i>Lactobacillus</i> .
ADN.....	acide désoxyribose nucléaire.
ARNr.....	acide ribonucléase ribosomique.
g.....	gramme.
C°.....	degré Celsius.
pH.....	Potentiel d'hydrogène.
sp.....	espèce.
MRS.....	Man, Rogosa et sharpe.
ml.....	millilitre.
µl.....	microlitre.

Liste des figures

Figure 1: Aspect des conidies de quelques espèces appartenant au genre <i>Alternaria</i> .	3
Figure 2: Symptômes de l'alternariose : taches sur foliole de tomate provoquée par <i>Alternaria tomatophila</i> et <i>A. alternata</i> .	7
Figure 3: Lésions provoquées par <i>Alternaria tomatophila</i> et <i>A. alternata</i> sur tige et collets.	8
Figure 4: Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par <i>Alternaria tomatophila</i> (A) et par <i>A. solani</i> (B), <i>A. arborescens</i> et <i>A. alternata</i> (C).	8
Figure 5: symptômes d' <i>A. dauci</i> sur carotte, (a) symptômes sur feuille, (b) dégâts observés au champ, les feuilles âgées sont entièrement détruites.	9
Figure 6: Cycle infectieux de l'Alternarios.	12
Figure 7: Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles Et F, la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir.	16
Figure 8: <i>Lactococcus lactis</i> subsplactis sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche.	18
Figure 9: Le champ de prélèvement des échantillons de la Tomate (région de Sidi Lakhdar).	29
Figure 10: Le champ de prélèvement des échantillons de la carotte (région d'Achachaa).	29
Figure 11: La position de la Wilaya de Mostaganem.	30
Figure 12: Les étapes de la désinfection de la surface.	31
Figure 13: Isolement de l'agent pathogène des feuilles, fruit, tige, de racines et collets de tomate.	32
Figure 14: Isolement de l'agent pathogène des feuilles et de fruit de carotte.	33
Figure 15: Les étapes de la technique monospore.	35
Figure 16: Etape pour la mesure de la sporulation. Identification des isolats.	36
Figure 17: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.	39
Figure 18: Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées.	40
Figure 19: Confrontation directe entre le pathogène et l'antagoniste sur milieu PDA.	41
Figure 20: Confrontation à distance entre le pathogène et l'antagoniste sur milieu PDA.	42
Figure 21: Les différentes méthodes utilisées pour la recherche de substances antimicrobiennes.	43
Figure 22: Isolât purifié de la tomate.	45
Figure 23: Isolât purifié de la carotte.	46
Figure 24: Evaluation des caractères morphologique microscopique <i>Alternaria Sp.</i>	47
Figure 25: Observation d' <i>Alternaria Sp.</i> Sur microscope.	48
Figure 26: Schéma explicative d'un champignon <i>Alternaria Sp.</i>	49
Figure 27: Observation microscopique de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> (A) et <i>Enterococcus sp</i> (B) après coloration de Gram (G x100).	50
Figure 28: Résultat de test de la catalase.	50
Figure 29: Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les champignons phytopathogènes.	52
Figure 30: Pourcentage d'inhibition d' <i>Aalternaria sp.</i> Par les métabolites des <i>lactobacillus plantarum</i> et <i>Enterococcus facium</i> .	53

Liste des tableaux

Tableau 1: les caractéristiques d' <i>Alternaria sp.</i>	4
Tableau 2: Déchiffrage des souches lactique.	28
Tableau 3: Caractères cultureux des isolats d' <i>Alternaria sp.</i> Sur milieu PDA.	44
Tableau 4: Caractéristiques morphologiques d' <i>Alternaria sp.</i>	48

Résumé

Le contrôle des microorganismes phytopathogènes par des pesticides présentent des complications sanitaire pour l'Homme et pour l'environnement auxquels s'ajoute le risque d'apparition de nouveaux pathotypes résistants. Certains microorganismes peuvent servir d'excellents agents de lutte biologique contre les maladies cryptogamiques.

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.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries naturellement immunisées contre leurs propres bactériocines. Ce travail a permis l'identification de nombreuses souches de bactéries lactiques productrices de peptides antimicrobiens.

L'objectif de notre travail consiste à tester l'activité antifongique des bactéries lactique vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolées à partir des feuilles, tiges et collets, des racines et des fruits de deux plantes telle la tomate et la carotte présentant la maladie cryptogamique d'Alternariose , les plantes ont été prélevées dans deux différentes régions de Mostaganem. L'isolement et la purification des isolats ont été établis sur des milieux MEA et PDA. L'identification macroscopique et microscopique nous a permis de mettre en évidence des souches représentent le genre d'*Alternaria sp.*

L'effet antifongique a été recherché par la méthode de confrontation que soit directe ou à distance chez deux souches de bactéries lactiques, isolées du lait cru de chamelle et de chèvre. Un pourcentage de 100% des isolats ont montré une activité inhibitrice contre *Alternaria sp*, appartenait du genre d'*Enterococcus faecium*. et de *Lactobacillus plantarum* produisent des composés antifongiques actifs contre *Alternaria sp*, Un changement dans les zones d'inhibition a été détecté après les méthodes de confrontation, Une inhibition a été observée.

Mots clés: *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, substances antifongiques, *Alternaria sp*, activité antifongique.

الملخص

ان التحكم في الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض النباتية بواسطة المبيدات يمثل عيوباً للإنسان والبيئة، ويضاف إليها خطر ظهور أنماط مرضية مقاومة جديدة. يمكن لبعض الكائنات الحية الدقيقة أن تكون بمثابة عوامل تحكم بيولوجية ممتازة ضد الأمراض الفطرية.

يعتمد حفظ الطعام في المقام الأول على التخلف أو تثبيط نمو الكائنات الحية الدقيقة الملوثة، ويعتبر النشاط المضاد للفطريات لبكتيريا حمض اللاكتيك أحد الخصائص التكنولوجية المرغوبة.

البكتيريوسينات هي ببتيدات مضادة للميكروبات تنتجها البكتيريا بشكل طبيعي مناعة ضد البكتيريا الخاصة بها. مكن هذا العمل من تحديد العديد من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتج الببتيدات المضادة للميكروبات.

الهدف من عملنا هو اختبار النشاط المضاد للفطريات لبكتيريا حمض اللاكتيك ضد الفطريات الممرضة للنبات المعزولة من أوراق وسيقان وتيجان وجذور وثمار نباتين مثل الطماطم والجزر التي تقدم مرض *Alternaria*، تم جمع النباتات من منطقتين مختلفتين في Mostaganem. تم إجراء عزل وتنقية العزلات على وسائط MEA وPDA. تم إجراء عزل الممرض (تحت نفس الظروف السابقة) لمزيد من العمل. يمثل التحديد العياني والمجهري للسلالات جنس *Alternaria sp*.

تم البحث عن التأثير المضاد للفطريات بطريقة المواجهة سواء المباشرة أو البعيدة في سلالتين من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الإبل والماعز الخام. أظهرت حوالي 100% من العزلات نشاطاً مثبطاً ضد *Alternaria sp*، تنتمي إلى جنس *Enterococcus faceium* و *Lactobacillus plantarum* ينتج مركبات مضادة للفطريات فعالة ضد *Alternaria sp*، تم اكتشاف تغير في مناطق التثبيط بعد طرق المواجهة، لوحظ تثبيط.

الكلمات الأساسية: *Enterococcus*، *Lactobacillus*، مواد مضادة للفطريات، *Alternaria sp*،

الحفظ البيولوجي.

Abstract

The control of phytopathogenic microorganisms by pesticides presents disadvantages for humans and the environment, to which is added the risk of the emergence of new resistant pathotypes. Certain microorganisms can serve as excellent biological control agents against fungal diseases.

Food preservation is based primarily on the retardation or inhibition of the growth of contaminating microorganisms, and the antifungal activity of lactic acid bacteria is one of the sought-after technological properties. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria naturally immune to their own bacteriocins. This work has enabled the identification of many strains of lactic acid bacteria that produce antimicrobial peptides.

The objective of our work is to test the antifungal activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic fungi isolated from the leaves, stems and crowns, roots and fruits of two plants such as tomato and carrot presenting the *Alternaria* disease, the plants were collected from two different regions in Mostaganem. Isolation and purification of isolates were performed on MEA and PDA media. Isolation of the pathogen was performed (under the same previous conditions) for further work. Macroscopic and microscopic identification of strains represents the genus of *Alternaria* sp.

The antifungal effect was sought by the confrontation method, either direct or remote, in 2 strains of lactic acid bacteria isolated from raw camel and goat milk. About 100% of the isolates showed inhibitory activity against *Alternaria* sp, belonged to the genus *Enterococcus faecium*. And *Lactobacillus plantarum* produce antifungal compounds active against *Alternaria* sp, A change in the zones of inhibition was detected after the confrontation methods, An inhibition was observed.

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



Introduction

Introduction

La situation alimentaire actuelle de l'Algérie nécessite une meilleure prise en charge de l'amélioration de la production agricole de large consommation de la tomate et la carotte d'un point de vue agronomique ces cultures sont aisées et d'un point de vue commercial, elles sont très appréciées par les populations algériennes.

Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures, ces maladies parasitaires sont causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires, les phanérogames, parasites, etc...). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine. Les champignons phytopathogènes sont responsables de maladies cryptogamiques et sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (**Lepoivre, 2003**).

A l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. D'après la (**F.A.O, 1999**), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique (**Aouar, 2012**).

Les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les champignons phytopathogènes présentent des inconvénients. La plupart d'entre eux, sont toxiques pour les utilisateurs qui entrent en contact avec la substance de préservation. Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement. De ce fait, la lutte biologique contre ces moisissures phytopathogène, s'avère très importante, et ce par l'utilisation de microorganismes producteurs de substances à effet antifongique. La lutte biologique se considère comme une alternative très prometteuse, à cause de l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes. Ces dernières se caractérisent par leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action ainsi leur persistance dans l'environnement (**De Kiuassi, 2001**).

Le contrôle biologique avec les microorganismes bénéfiques permet d'augmenter le rendement en supprimant directement l'inoculum pathogène et/ou en induisant la résistance des plantes. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes afin de les utiliser comme agents potentiels de lutte biologique.

Les bactéries lactiques sont fréquemment utilisées dans le processus de lutte contre ces phytopathogènes, ce moyen alternatif de protection des plantes par des antagonistes bactériens semble être une solution à la fois élégante et respectueuse de l'environnement, elle répond aux exigences économiques et écologiques. Cette forme de bio-protection permet de réduire et ou d'inhiber la croissance et le développement des champignons phytopathogènes. (Saidi et al., 2009). Leur capacité à produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH est le majeur facteur par lequel ces derniers 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 de ces derniers peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature prothéique appelés bactériocines.

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autres 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).

Parmi les champignons toxigènes qui contaminent les légumes, les fruits appartiennent au genre *Alternaria*, de cela, la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques, capable 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 cette optique, le but de ce travail est de :

- ✓ Isoler des souches de champignons phytopathogènes à partir de plantes malades.
- ✓ identifier les souches fongiques isolées.
- ✓ Etudier l'effet antagoniste de deux espèces des bactéries lactiques par des méthodes de confrontation avec les agents phytopathogènes isolés.

Vue la situation actuelle de pandémie de nouvelles infections (covid-19), une partie de travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie appliqué, d'autre part n'a pas été réalisé.

Chapitre 1 :

Partie bibliographique

I. Le parasite

I.1 Généralité sur le genre *Alternaria* :

Les *Alternaria*, hyphomycetesdématis, sont caractérisés par la production des spores d'un type particulier, les «dictyospres ». Les espèces correspondantes à ce genre produisent, au moins théoriquement, leurs dictyospores en chaines, selon un mode centrifuge ; chaque spore bourgeonnant une spore fille montre à sa partie apicale, un rétrécissement en forme de bec. Ce caractère n'existe pas obligatoirement chez toutes les spores, la dernière formée de chaque chaine en étant généralement dépourvue (**Bessadat, 2014**).

A l'exception de quelque espèce aux conidies produisent en chaines, exemple : *Alternaria tenuis* sur tomate. La plupart des *Alternaria*, parasites des plantes maraichères, ont de très grandes spores solitaires, pourvue le plus souvent d'un appendice filiforme c'est le cas des *Alternaria* sont doués d'une très grande longévité (**Kaned et al., 2017**).

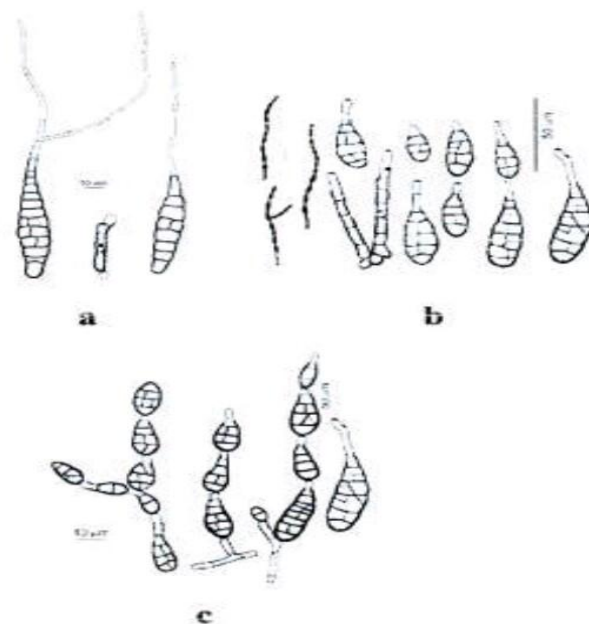


Figure 1: Aspect des conidies de quelques espèces appartenant au genre *Alternaria* (**Carillo, 2002**).

- a. *Alternaria dauci*.
- b. *Alternaria tenuissima*.
- c. *Alternaria tenuis*.

Chapitre I : Partie bibliographique

I.2 Classification du genre *Alternaria* :

La classification chez les *Alternaria* est fondée, sur la longueur des chaînes de spores et la taille de cette dernière d'après (Neergaard, 1945); (Joly, 1964); (Grillot, 1981); (Nechev, 1989); (Anisworth et al., 1961) :

Embranchement : Thalophytes.

Sous-embranchement : Septomycetes.

Classe : Deutéromycètes.

Ordre : Mucédinales.

Famille : Dématiaceae.

Genre : *Alternaria*.

Espèces : *dauci*.

I.3 Caractéristiques distinctives :

Regroupé dans le tableau suivant, d'après (Viennot, 1949); (Joly, 1964) et (Chou et Wu, 2002):

Tableau 1: les caractéristiques d'*Alternaria sp.*

Classe : Deutéromycètes= Champignon imparfait= Adéromycètes	Organisme dont la reproduction sexuée inconnue se présente sous deux formes : L'appareil végétatif constitué par un mycélium cloisonné et l'appareil de reproduction asexué qui forme des spores de dissémination.
Ordre : Mucédinales= Moniliales= hyphes.	Caractérisé par des conidiophores généralement bien développés, séparés les uns des autres. Mycélium et conidies hyalins ou blanchâtres.
Famille : Dematiacées.	Conidies et conidiophores, colorés de teinte sombre et fortement pigmentés, mycélium et spores muriformes.
Sous famille : Dictyosporales	Conidiophores simples ou ramifiés, spores muriformes.
Genre : <i>Alternaria</i>	Caractérisé par des conidies pluricellulaires en masse fortement colorées et pédiculées, regroupe de nombreuses espèces saprophytes ou parasites.

I.4 Systématique du genre *Alternaria* :

Position taxonomique et morphologie des conidies et des colonies :

Alternaria dauci (Kuhn) (Croves et Skolko, 1944) appartient à la famille des *Pléosporacées*, à l'ordre des *Pleosporales* et à la classe des ascomycètes. *A. dauci* possède une reproduction exclusivement asexuée sous forme de conidies produites en abondance par un conidiophores érigé. Les conidiophores sont de couleur brun-olive, flexueux et produisent généralement une seule conidie. Comme chez toutes les espèces d'*Alternaria*, les conidies d'*A. dauci* sont mélanisées. Elles sont cloisonnées transversalement et longitudinalement. Les conidies matures possèdent un long bec terminal (80 – 250 x 5 µm) pouvant se ramifier en 2 ou 3 branches (Champion, 1997). Les colonies d'*A. dauci* sur milieu gélosé sont pourvues d'un mycélium aérien court gris foncé au centre et plus claire à la périphérie.

Le contour des colonies est d'aspect ondulé. Une pigmentation brun-rougeâtre, plus ou moins intense peut apparaître dans le milieu de culture (Champion, 1997).

II. La plante hôte :

II.1 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 (Naika et al., 2013). 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: *Solanumly copersicum* L et *Lycopersiconly copersicum*. (L.) Karsten (Peralta et al., 2006).

II.2 La carotte :

L'ancêtre sauvage de la carotte (*Daucus carota*) provient d'Afghanistan, qui reste le centre de la diversité de cette plante. La carotte sauvage est une parente de la carotte du jardin. Au début la carotte du jardin produit sa partie comestible la première année, fruits, fleurit, la deuxième année. Si on la laisse monter en graine, elle retourne rapidement à son prototype sauvage qui est théoriquement comestible, mais trop amer et fibreux pour être mangé. Au mésolithique final, elle est non différenciée du panais. On peut distinguer deux variétés de carotte : la carotte de l'Est et la carotte de l'Ouest. (Péron, 2006).

La carotte de l'Est a été domestiquée au X^e siècle et même peut être plus tôt en Asie Centrale, probablement dans ce qui est l'Afghanistan présent. Les carottes de l'Est, qui sont encore présentes aujourd'hui, sont souvent violettes ou jaunes et ont parfois une racine branchée. La couleur violette est due à la présence d'anthocyanes. (Péron, 2006). La carotte de l'Ouest est apparue à la Renaissance, au XVII^e siècle, en Hollande, suite à des sélections naturelles, cette première carotte charnue, appelé la « Longue Orange ». Les variétés maraîchères sont cultivées comme des plantes annuelles, car ce qui intéresse le jardinier est la racine tubérisée et non la graine. La plupart des variétés présentent une couleur orange caractéristique. Il existe aussi des carottes fourragères blanches. Des variétés anciennes, actuellement en voie d'extinction, sont aussi de couleur rouge, violette ou jaune.

II.3 *Alternaria* pathogène des tomates :

II.3.1 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.

II.3.2 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 discret

Chapitre I : Partie bibliographique

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**).(Fig. 2).

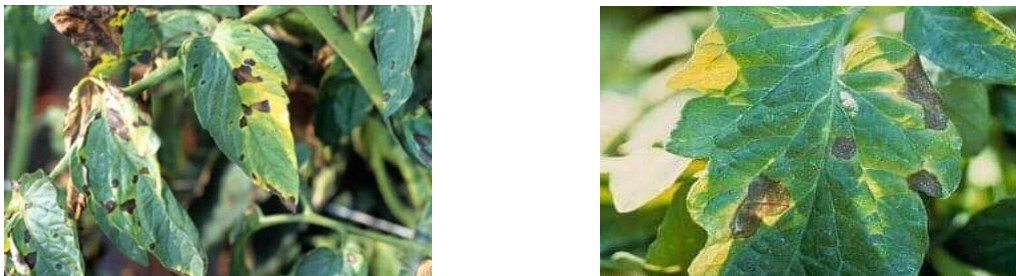


Figure 2: Symptômes de l'alternariose : taches sur foliole de tomate provoquée par *Alternaria tomatophila* et *A.alternata* (sensu lato).

II.3.3 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**), les lésions ne parviennent pas à ceinturer les tiges en particulier avec les variétés qui ont des tiges plus épaisses (**Saliba, 2015**). Ces lésions ou chancres progressent lentement sur la tige, une fois celle-ci est ceinturée la plante meurt. Des petites lésions brunes apparaissent ensuite entre les plus grandes lésions.

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 3: Lésions provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata* sur tige et collets.

II.3.4 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 (Fig. 4). Un dense feutrage les recouvre à 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 (Fig.4. 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 (Fig.4).

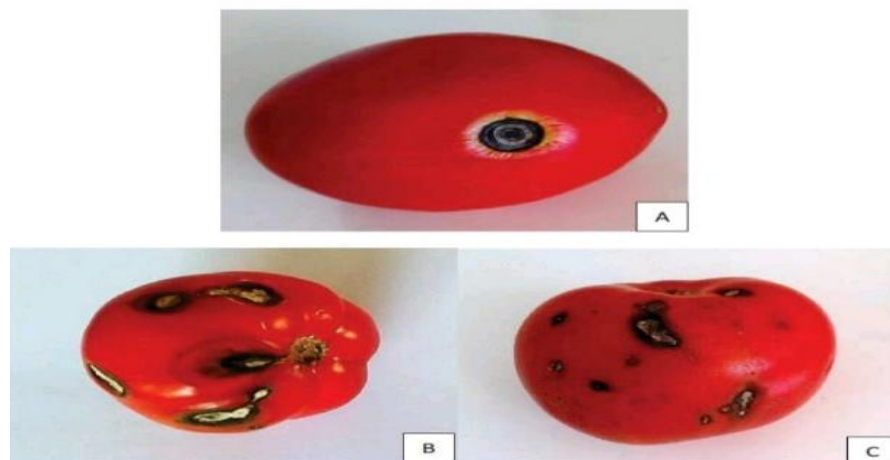


Figure 4: Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par *Alternaria tomatophila* (A) et par *A. solani* (B), *A. arborescens* et *A. alternata* (C).

II.4 *Alternaria* pathogène des carottes :

La carotte peut être confrontée à de nombreuses maladies, dont les brûlures foliaires. Les brûlures foliaires sont des maladies dues à différents agents pathogènes, mais aux symptômes similaires (taches nécrotiques coalescentes entourées ou non d'un halo chlorotique). La distinction sur le terrain n'est pas toujours possible. Cependant, en fonction de l'agent causal, on peut distinguer l'alternariose provoquée par le champignon *Alternaria dauci*, la cercosporiose (*Cercosporacarotae*) et la brûlure bactérienne (*Xanthomonashortorumpv. carotae*=*Xanthomonas*pv.*carotae*).

II.4.1 Symptomalgie de la maladie :

Les symptômes provoqués par *Alternaria.sp* correspondent à des brûlures foliaires. Pendant la colonisation, les cellules adjacentes au mycélium perdent leur chlorophylle et deviennent nécrotiques. Ces symptômes apparaissent 8-10 jours après l'infection (**Strandberg, 1992**). Ce sont de petites lésions brun-verdâtre, qui s'agrandissent et forment des nécroses brun-noir entourées d'un halo chlorotique (**fig. 5a**). En conditions favorables pour le développement du champignon, les lésions coalescent et engendrant une sénescence précoce du feuillage et la réduction du nombre de feuilles vivantes par plante (**Fig. 5b**). Les lésions sont communément observées en bordure des folioles, mais peuvent apparaître sur toutes les parties de la feuille (limbe et pétiole) (**Farrar et al., 2004**).

On considère généralement qu'*A. dauci* se développe sur les feuilles de la carotte les plus âgées, lorsque les plantes ont atteint le stade 7-8 feuilles. Le stade 2-3 feuilles serait également très sensible. Les tous premiers symptômes se présentent sous forme de très petites taches disséminées et peu visible. Au cours du temps, ces symptômes se développent et la carotte forme de nouvelles feuilles. En conséquence les 2^e et 3^e feuilles, qui ont été attaquées bien plus tôt, montrent les symptômes les plus visible sur les plantes ayant atteint le stade 7-8 feuilles.



Figure 5:symptômes d'*A. dauci* sur carotte, (a) symptômes sur feuille (génotype Presto) (**Boedo et al., 2006**), (b) dégâts observés au champ, les feuilles âgées sont entièrement détruites (**Farrar et al., 2004**).

Chapitre I : Partie bibliographique

Des confusions sont possibles en ce qui concerne les symptômes causés par *A. dauci* et *Cercosporacarota*. Cependant *A. dauci* se manifeste tardivement en saison alors que la cercosporiose apparaît plus précocement.

Bien que les symptômes sur les feuilles apparaissent au stade floraison. L'infection des bourgeons floraux et des fleurs peut mener à la contamination des semences non viables (**Strandberg, 1983**).

Au niveau des semences, des contradictions existent ce qui concerne la localisation d'*A. dauci* dans les tissus. D'après Strandberg 1983, le champignon reste dans le péricarpe et ne pénètre pas dans l'embryon, ni dans l'albumen, mais d'après Champion (1997), la localisation du champignon dans la semence est parfois très profonde et l'albumen ainsi que l'embryon peuvent être envahis. Les semences infectées par *A. dauci* peuvent transmettre l'agent pathogène dans de nouvelles zones de production de la carotte ou disséminer de nouvelles souches dans des aires de production déjà contaminées (**Strandberg, 1987**). Les plantules de carotte peuvent être colonisées par le mycélium du champignon issu d'une semence contaminée ou de l'inoculum du sol. Les attaques précoces peuvent aussi conduire à des fontes de semis. L'infection des plantules apparaît typiquement au niveau du collet. Les tissus infectés de la plantule se nécrosent puis se dessèchent et deviennent brun-noir. En conditions favorables, le champignon présent sur les plantules infectées peut produire des conidies en abondance, qui serviront alors de source d'inoculum secondaire (**Farra et al., 2004**).

II.5 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 nécro gènes), la sporulation puis la dissémination.

II.5.1 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., 1999**). 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.

(Neergaard, 1945 ; Ellis et Gibson, 1975 ; Blancard et al., 2012).

II.5.2 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)(Fig.6). 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 (Trail et Koller, 1993 ; Yao et Koller, 1995). *A. citri* semble dépendant de la présence d'endopolygalacturonases pour pénétrer son hôte, puisque le mutant déficient en cette enzyme est altéré dans sa capacité à établir une infection (Isshiki 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).

II.5.3 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 (Sandrock et Vanetten, 1998). Sur les tissus colonisés, quand les conditions climatiques sont humides,

Alternaria ne retarde pas à produire de courts conidiophores. 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 parasites pourront avoir lieu dans la culture (Sherf et Macnab, 1986 ; Andersen et Frisvad, 2004 ; Leiminger et al., 2010 ; Blancard et al., 2012) (fig.6).

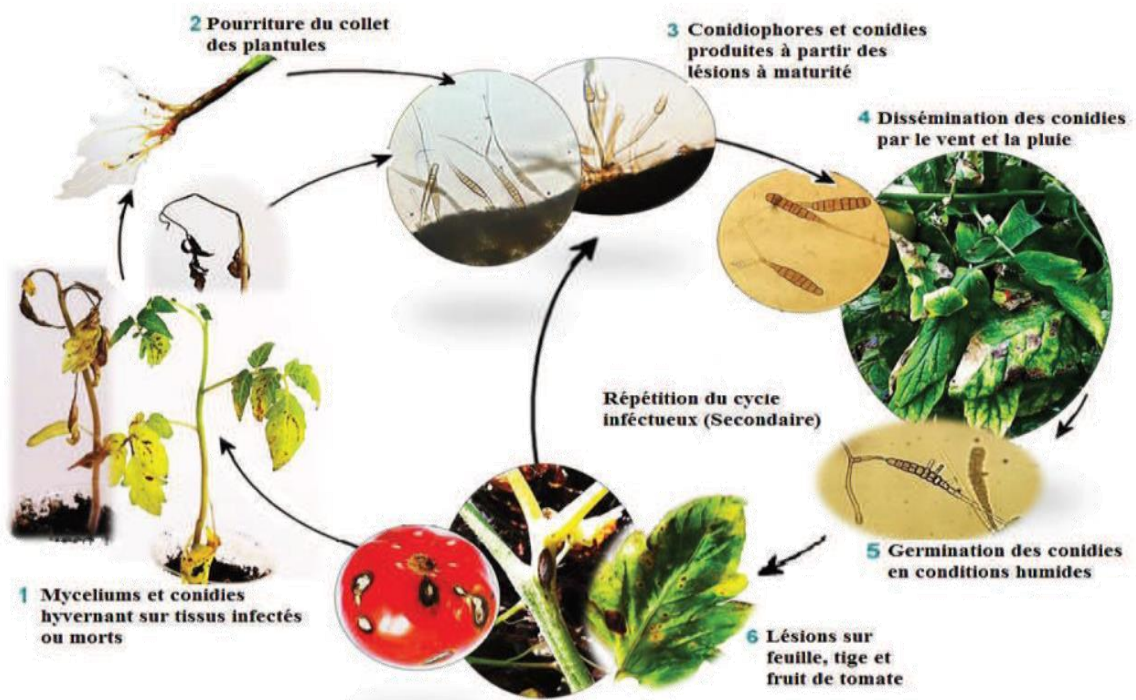


Figure 6: Cycle infectieux de l'Alternarios.

II.6 Méthodes de lutte contre *Alternaria* :

II.6.1 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 contrôle agent : BCA) ainsi que les produits qu'ils en dérivent (Lepoivre, 2003).

Plusieurs antagonistes potentiels sont signalés dans la littérature : des bactéries (*Pseudomonas*

Chapitre I : Partie bibliographique

fluorescens, *Bacillus spp.*, etc.) comme des champignons (*Trichodermapolysporum*, *Chaetomiumglobosum...*) ; leurs performances ne semblent toutefois pas importantes en situation d'épidémie naturelle (**Blancard et al., 2012**).

Quelques études de cas sur *Trichodermaspp.* 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 *Trichodermaspp.* S'expliquent par la compétition pour les éléments nutritifs, l'antibiose ainsi que le parasitisme (**Yedidia et al., 2000**). *Trichodermaspp.* 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**).

Premier travail sur le contrôle de la pourriture brune des fruits à noyau par *Bacillus subtilis* était initié par (**Pusey et Wilson, 1984**) ; depuis, beaucoup d'antagonistes ont été identifiés et utilisés pour le contrôle de l'alternariose sur différents fruits et légumes. 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 caractérisé comme composés antifongiques contre plusieurs champignons et oomycètes phytopathogènes (**Romeo et al., 2007 ; Ongena et Jacques, 2008 ; Arrebola et al., 2010**). L'iturine peut également avoir un potentiel antibactérien supplémentaire.

Les lipopeptides fengycine 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 surfactines sont essentiels pour la motilité. Les surfactines agissent comme des molécules de signalisation pour la formation de biofilm qui

semblent être nécessaire pour la colonisation de la surface des racines et des feuilles par les bacilles associés aux plantes (**Jourdan et al., 2009**).

III. Les bactéries lactiques

III.1 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**).

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 reutérine, 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**).

III.2 Caractéristiques générales des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positive à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, au point de vie enzymatique catalase, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotoles (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, acides 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 et autres acides organiques). Elles ont une faible capacité de biosynthèse (Luquet, 1986).

III.3 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

III.3.1 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.

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.7 - 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).

Chapitre I : Partie bibliographique

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).

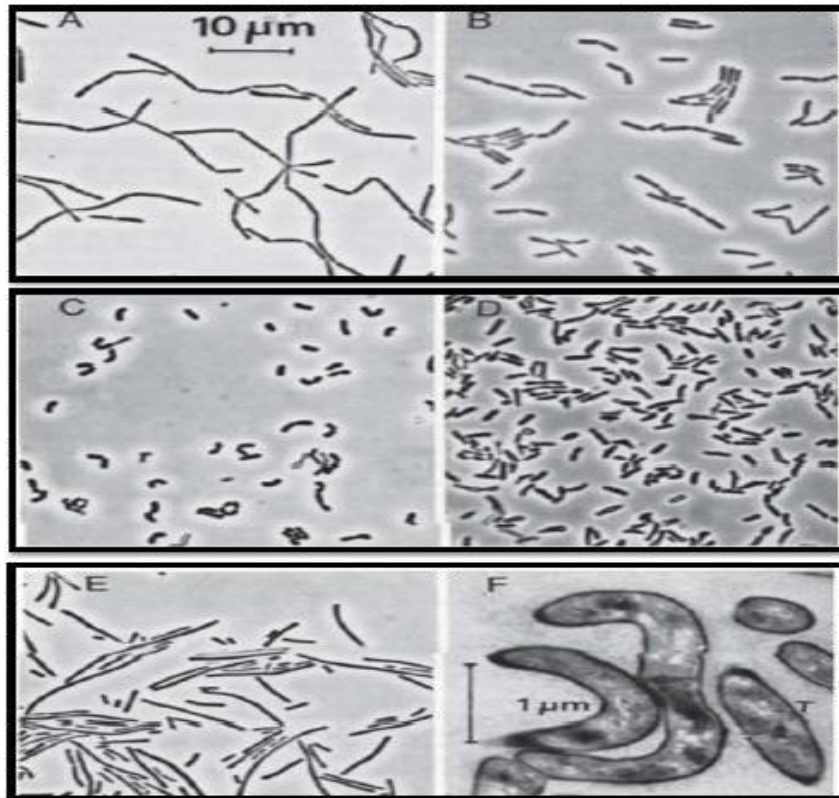


Figure 7:Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles (De Vos et al., 2009). Et F, la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir.

A 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*. 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 à 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 à 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 ; Bakhouché, 2006).

III.3.2 Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et *Fructobacillus*:

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acidelactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. Les caractéristiques telles que hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, 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).

III.3.2.1 Le genre *Leuconostoc*:

Les *Leuconostocs* sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies facultatives avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes (Lahtinen et al., 2012). Les *Leuconostocs* principalement *Leuc. Mesenteroides* sub sp. *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 diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hadeif, 2012).

III.3.2.2 Le genre *Weissella* :

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. cetiet* *W. fabalis* (Zhang et Cai, 2014).

III.3.2.3 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 d'éthanol (Bjorkroth et Holzapfel, 2006 ; Zhang et Cai, 2014).

III.3.3 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).

III.3.3.1 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.8).

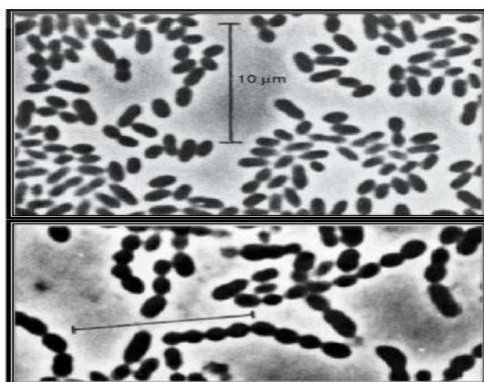


Figure 8: *Lactococcus lactis* subsplactis sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* sub sp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyle. (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen et al., 2004 ; Teuber et Geis, 2006 ; Lahtinen et al., 2012 ; Schleifer et al., 2009).

III.3.3.2 Le genre *Enterococcus* :

Ce groupe des coques Gram-positifs ayant un faible contenu en G+C (<50%), exemptes de l'enzyme catalase, et disposés en paires ou en chaînes courtes. Ils sont anaérobies facultatifs, chimio-organotrophes, exemptes 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 (Kayser, 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 exemptes 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 certaines souches de lactocoques croissent à 45°C, tandis que la majorité des lactocoques. *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).

III.3.3.3 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. themophilus* 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).

III.4 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 (**Langelle 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 (**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 (**Mkrtychyan 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**).

III.5 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, l'acétylsalicylate 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.

III.6 Activité antifongique

III.6.1 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**).

Chapitre I : Partie bibliographique

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., 2010 ; 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).

III.6.2 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 *Mycotorulalipolytica*, 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).

III.6.3 Les acides organiques :

Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits par 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).

III.6.4 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 (Dridier 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 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).

III.6.5 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). S ce n'étant l'absence du peptide leader, l'action synergique des deux peptides EntL50A et EntL50B pourrait permettre de placer l'entéroccine L50 dans la classe IIb. L'entéroccine L50 est également produite par d'autres souches d'*Enterococcus* telles qu'*En. Faecium*6T1a et *En. faecium*MRR10-3. Elles sont respectivement appelées entéroccine I/ J (Floriano et al., 1998, Ruiz-Barba et al., 2007) et entéroccine MR10R/ MR10B (Martin-Platero et al., 2006). Une autre bactériocine, l'entéroccine RJ-11, est un peptide unique produit par *En.Faecalis*RJ-11, similaire à l'EntL50A. Contrairement aux entéroccines Ent50A et Ent50B, l'entéroccine RJ-11 agirait probablement seule (Yamamoto et al., 2003). En plus de porter les gènes codant la batériocines L50, le plasmide pC1Z2 renferme un gène codant une autre bactériocine de classe IId, l'entéroccine (Cintas et al., 2000). Les gènes codant les précurseurs des deux bactériocines sont généralement co-exprimés (Cintas et al., 2002.Criado et al., 2006).

III.6.6 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., Iwatani et al., 2007). De plus, la

séquence de la région *N*-terminale des lactocines Q et Z est proche de celle de l'auréocine A53.

III.7 Méthodes de conservation :

III.7.1 Méthodes de conservation des souches lactiques :

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)**.

III.7.2 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 **(Strett, 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 **(Larpen, 1997)**.

III.7.3 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.

III.7.3.1 Lyophilisation des bactéries lactiques :

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.

Chapitre II :
MATERIEL ET
METHODES

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

I. Objectif :

Ce travail est réalisé au laboratoire de Microbiologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie durant la période de covid-19. L'objectif de ce travail, consiste à étudier l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chamelle, chèvre et vache vis-à-vis des champignons phytopathogènes du genre *Alternaria* isolé à son tour de la tomate et de carotte représentant des symptômes foliaire d'alternariose sur la tige, fruit et feuilles de ces dernier.

II. Matériels :

II.1 Matériel biologique :

II.1.1 Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été principalement fournies par Mr ZABOURI enseignant au département des sciences Alimentaires à l'université de Mostaganem, identifiées par la biologie moléculaire ; les bactéries lactiques sont : une souche de *Lactobacillus plantarum* et une souche *Eterococcus faecium* isolés à partir du Lait de chèvre et lait de vache. (Tab. 02).

Tableau 2:Déchiffrage des souches lactique.

Les souches	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Eterococcus faecium</i>
Chiffres	4.18	35

II.1.2 Les souches fongiques :

Les souches pathogènes d'*Alternaria. sp* utilisées au cours des manipulations proviennent d'un isolement effectué à partir des différents sites de prélèvements à partir de la plante de Tomate et de la Carotte qui sont présentant les symptômes d'une maladie fongique.

II.1.2.1 Echantillonnage :

Dans cette étude deux espèces de plantes ont été choisies pour l'isolement des champignons phytopathogène *Alternaria*. Ces plantes sont la tomate et la carotte.

L'échantillonnage a été effectué en Mars (2020) à différents régions de l'ouest Algérien dans la wilaya de Mostaganem (Achachaa et Sidi Lakhdar).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

Tous les échantillons sont recueillis dans des sacs stériles et sont acheminés au laboratoire pour être analysés.



Figure 9: Le champ de prélèvement des échantillons de la Tomate (région de Sidi Lakhdar).



Figure 10: Le champ de prélèvement des échantillons de la carotte (région d'Achachaa).

II.1.2.2 Situation géographique :

La wilaya de Mostaganem est située sur le littoral Ouest du pays et dispose d'une façade maritime de 124km. Elle est limitée par : **(Fig. 11)**

- La mer méditerranée au Nord ;
- La wilaya de Relizane au Sud-est
- La wilaya de Mascara au Sud-ouest ;
- La wilaya d'Oran à l'Ouest ;
- La wilaya de Chlef à l'Est

Le Chef-lieu de la wilaya est situé à 365 km à l'Ouest de la capitale de l'Algérie (Alger).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

Le relief de la wilaya de Mostaganem se divise en quatre unités morphologiques appartenant à deux régions distinctes, le plateau et le Dahra :

- Les vallées basses de l'Ouest englobent les communes : HassiMameche, Mazagran, Stidia, Ain Nouissy, El Hassaine et Fornaka.
- Les Monts du Dahra englobent les Sidi Belattar, Oued El Kheir, Sidi Ali, OuledMaallah, Tazgait, Nekmaria, Kheireddine, Ain Boudinar et Safsaf.
- Le plateau de Mosraganem englobe les communes : Mostaganem, Ain Tedles, Sour, Bouguirat, Sirat, Souaflia, Mesra, Ain Sidi Cherif, Mansourah, Touahria et Sayada.
- Les vallées de l'Est englobent les communes : Achachaa, Lhadra, OuledBoughalem, Sidi Lakhdar, Hadjadj et Abdelmalek Ramdane.

II.1.2.3 Le climat prépondérant sur la zone :

- Le climat de Mostaganem se caractérise par une température douce, la faiblesse des écarts thermiques, l'alternance quasi quotidienne des brises de mer et de terre et une pluviométrie naturelles notamment en matière de terres agricoles. Sur une superficie totale des terre utilisées par l'agriculture évaluée à 144 778 Ha, la surface agricole utile s'élève à 132 268 Ha, La production végétale est très diversifiée, céréales, fourrages, maraichage, légumes secs, arboriculture, viticulture.
- Le domaine forestier occupe une superficie de 30.767 Ha, soit 13,6% de la superficie totale de la Wilaya. La flore est constituée essentiellement d'espèces Méditerranéennes avec la prédominance du Pin d'Alep qui couvre le tiers de la superficie forestière. Les forêts naturelles occupent 44% du domaine forestier contre 56% pour les forets artificielles. (Aniref, 2013).



Figure 11: La position de la Wilaya de Mostaganem (Aniref, 2013).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.1.3 Milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés sont : milieu MRS (liquide et solide) sélectif pour les Bactéries lactiques, et milieu de culture PDA (potato dextrrose agar). La gélose à la pomme de Terre et au dextrrose (PDA) est le milieu le plus largement utilisé pour la croissance des Champignons (**Harold Eddleman**, pH. D (February 1998)) et le milieu MEA (malt-excract-agar) généralement utilisée pour identifier les mycètes isolés.

III. Méthodes :

III.1 Les souches fongiques :

III.1.1 L'isolement de l'agent pathogène :

III.1.1.1 Stérilisation de la surface :

Une fois les matériaux végétaux (Tomate et Carotte) transportées au laboratoire ont été soumis à une procédure de stérilisation de surface selon un protocole de plusieurs étapes. Au départ, toutes les plantes ont été lavées dans de l'eau du robinet pour éliminer, les particules de sol et les débris adhérents. Ceci a été suivi par une désinfection avec l'eau de javel à 2% pendant 3 min, puis ils sont rincé 3 fois successive par l'eau distillée stérile pendant une minutes à chaque fois et en fin, ils sont séchés sur du papier absorbant stérile près du bec bunsen (**Boubacar et al ., 2009**).



Figure 12: Les étapes de la désinfection de la surface.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

III.1.1.2 Isolement des échantillons à partir des feuilles, fruit, racine de collets et des fragments des tiges :

L'isolement est réalisé à partir des fragments présentant les symptômes caractéristiques de chaque plante.

Les plants malades présentent les symptômes d'Alternariose (Inra, 2014).

La méthode est faite dans des conditions aseptique, les fragments malades sont découpés séparément en petits fragments à l'aide d'un scalpel stérile. Par la suite, ils sont désinfectés de la même manière comme rédigé précédent (stérilisation de la surface).

La désinfection est effectuée pour éliminer les microflore exogènes. Ces fragments sont déposés dans des boîtes de pétri, contenant le milieu PDA ou MEA (2 boîtes pour chaque échantillon 1 contenant le milieu PDA et autre le milieu MEA). Les boîtes sont mises à incuber sous une température de 25°C pendant 4 à 5 jours (Inra, 2014).



Figure 13: Isolement de l'agent pathogène des feuilles, fruit, tige, de racines et collets de tomate.



Figure 14: Isolement de l'agent pathogène des feuilles et de fruit de carotte.

III.1.2 Purification des souches :

III.1.2.1 Le repiquage successif :

Cette technique permet d'extraire le champignon recherché de la boîte de pétri aussitôt qu'il est identifié et que le développement du thalle est suffisant pour permettre un prélèvement. L'observation des boîtes à l'œil nu puis par la loupe binoculaire ou au microscope, au faible grossissement, permet de s'assurer que la colonie est exempte de contamination. L'identification des colonies développées à partir des fragments infectés est basée sur la morphologie des spores.

Pour la purification des souches fongiques, il suffit de prélever avec une anse stérile quelques spores ou un fragment mycélien à la marge du thalle de chaque colonie et de transférer l'inoculum individuellement sur une nouvelle boîte de milieu PDA +ATB (streptomycine ou chloramphénicol à raison de 20ml /100ml) pour minimiser la contamination, puis Les boîtes sont scellées avec du papier cellophane. L'incubation est réalisée à une température 25°C, pendant à 4-6 jours.

III.1.2.2 La culture monospore :

Néanmoins, les cultures obtenues risquent d'être contaminées par des bactéries qui sont parfois invisible et afin d'éviter ce risque, le procédé le plus simple et le plus sûr reste celui de la culture monospore (**Rappily, 1968**).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

La technique de la culture monospore (**Fig.15**) permet d'obtenir une culture pure à partir des spores fongiques par étalement sur un milieu GN (gélose nutritive).

- Dans un premier temps, la souche à monospore est repiquée dans une boîte contenant du milieu PDA et laissée se développer sur la totalité de la surface de la boîte pendant 05 à 06 jours.
- Un explant est prélevé à partir de la périphérie de la boîte et introduit dans un tube contenant 09 ml d'eau distillée stérile, après agitation, une suspension sporale est obtenue à partir de laquelle des dilutions au dixième sont réalisées comme suit :
 - ✓ 01 ml de la suspension sporale est prélevé puis introduite dans un tube contenant 09 ml d'eau distillée stérile. Cette opération est reproduite autant de fois jusqu'à la dilution volume.
 - ✓ A partir des deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}), 01 ml, est prélevé puis étalé à l'aide de billes stériles sur milieu GN.
 - ✓ Après 24h d'incubation à 25°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, le repérage et la délimitation des spores en germination sont effectués. Ces dernière sont prélevées à raison de 03 à 04 conidies puis déposées dans de nouvelles boîte de pétri contenant du milieu PDA puis incubées à 25°C pendant une semaine (**Rappily, 1968**).

III.1.2.3 Préparation de suspension monosporale :

Alternaria sp 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.

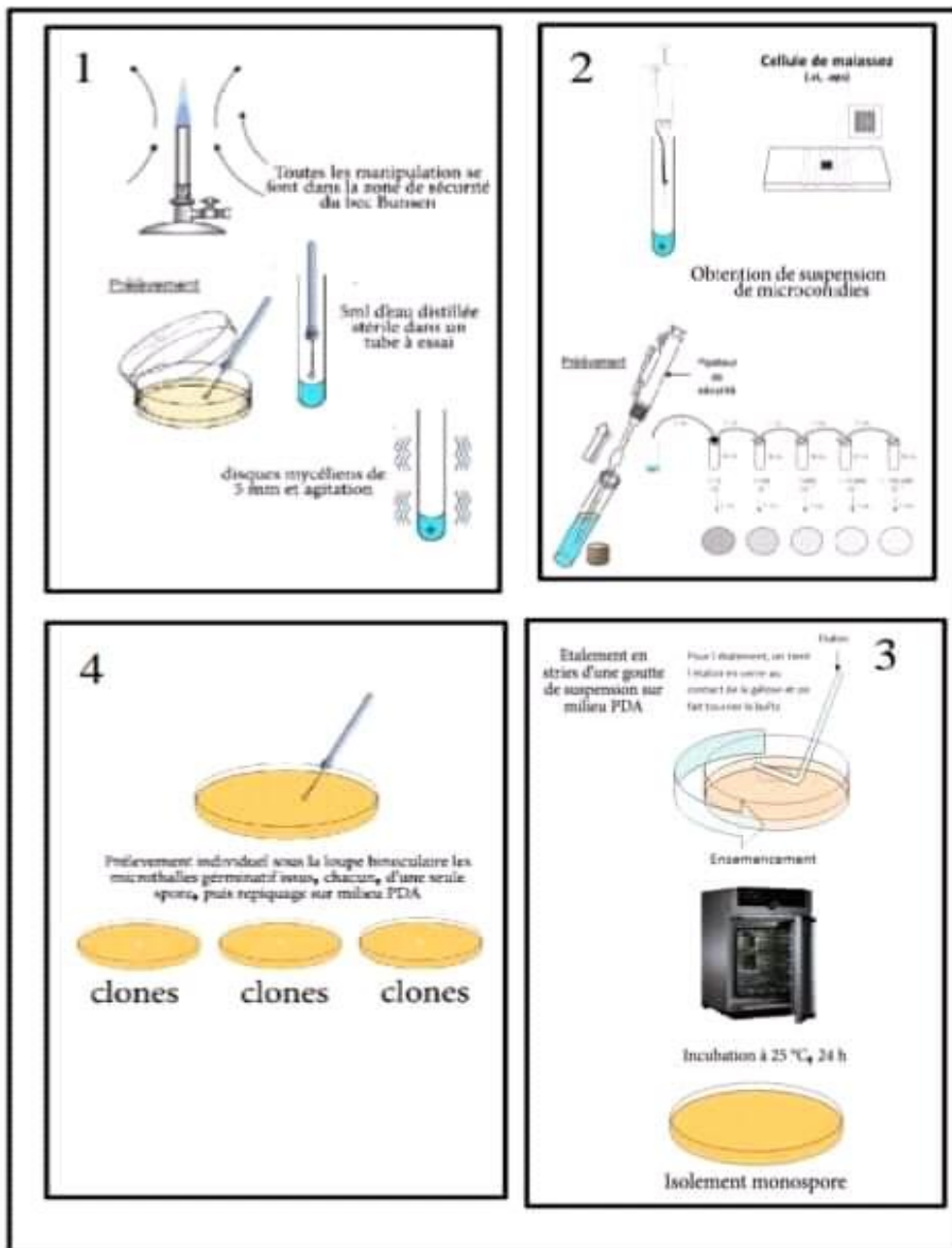


Figure 15: Les étapes de la technique monospore (d'après Booth, 1971 ;Bleabid, 2003).

III.1.2.4 Mesure de la sporulation fongique :

Pour déterminer la concentration initiale de chaque isolat, 10 ml d'eau distillée stérile est ajouté sur cultures en boîte de pétri, les conidies sont raclées de la surface de la colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile recourbée. La suspension de conidies est collectée et filtrée à travers deux couches de mousseline stérile. La concentration est ensuite déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez (**Fig.16**).

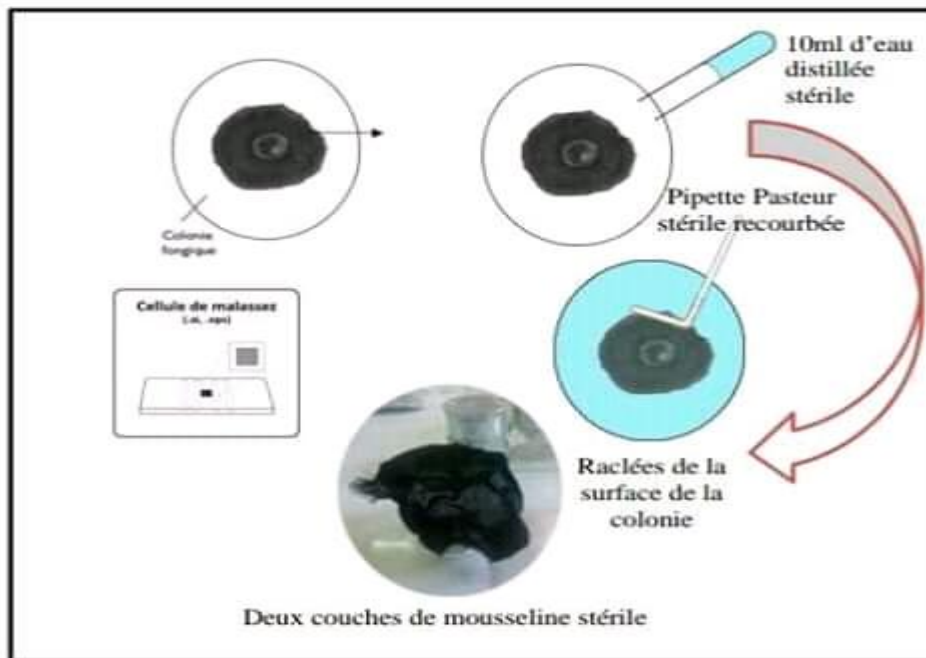


Figure 16: Etape pour la mesure de la sporulation. Identification des isolats

La détermination des genres et des espèces fait appel au caractère culturaux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique).

III.1.2.5 Identification macroscopique :

La caractérisation macroscopique des *Alternaria* sp est basée sur la morphologie de ces derniers c'est-à-dire la forme et la couleur de mycélium. L'identification se fait à l'œil nu ou à la loupe binoculaire, observé directement sur la gélose PDA /MEA après purification (Bessadat , 2014).

III.1.2.6 Identification microscopique :

III.1.2.6.1 Technique des lamelles :

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après la réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au lactophénole Bleu Coton.

Un fragment de colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet, une goutte de colorant lactophénole, est ensuite dissocié, puis recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Chabasse et al., 2002).

Un examen à l'objectif 100 suffit pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose. Les critères d'identification microscopique sont : le thalle (septé ou siphonné),

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

l'aspect, la forme et le thalle des spores et la présence ou l'absence des formes protectrices (Ghourri, 2015).

III.1.2.6.2 Technique du scotch :

La technique du scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène. Il convient d'éliminer l'excès de colorant autour du scotch avec une feuille de papier absorbant. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements 40 (Chabasse et al., 2002).

III.1.3 Conservation des souches fongique :

La conservation des souches fongiques de courte durée se fait sur gélose (MRS) ou (PSA) ou (PDA) inclinée en tube conservé à 4°C, les repiquages se font toutes les deux semaines ; et la conservation de longue durée se fait dans un milieu de culture de conservation qui contient MRS ou lait écrémé avec 30 % de glycérol en tube Eppendorf conservé à -18°C (Badis et al., 2005).

III.2 Les bactéries lactiques :

III.2.1 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 leur milieu sélectif d'enrichissement MRS liquide puis incubées pendant 24 à 48h à 37°C. Après incubation on voit un trouble et un anneau clair dans le sommet de tube.

Après repiquage, un 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.

Après incubation, on prend d'une colonie à l'aide d'une anse de platine et déposée dans un tube à essai contenant le milieu 9 ml MRS liquide. La pureté des souches est confirmée par examens macroscopiques et microscopiques.

III.2.2 Confirmation des bactéries lactiques :

III.2.2.1 Tests morphologiques :

III.2.2.1.1 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).

III.2.2.1.2L'aspect microscopique :

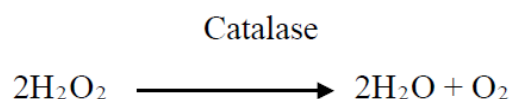
III.2.2.1.2.1 Coloration de Gram :

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame 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 en 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 Fuchsine 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**).

III.2.2.2 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**).

III.2.3 Conservation des bactéries lactiques :

III.2.3.1 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). (Fig. 17).

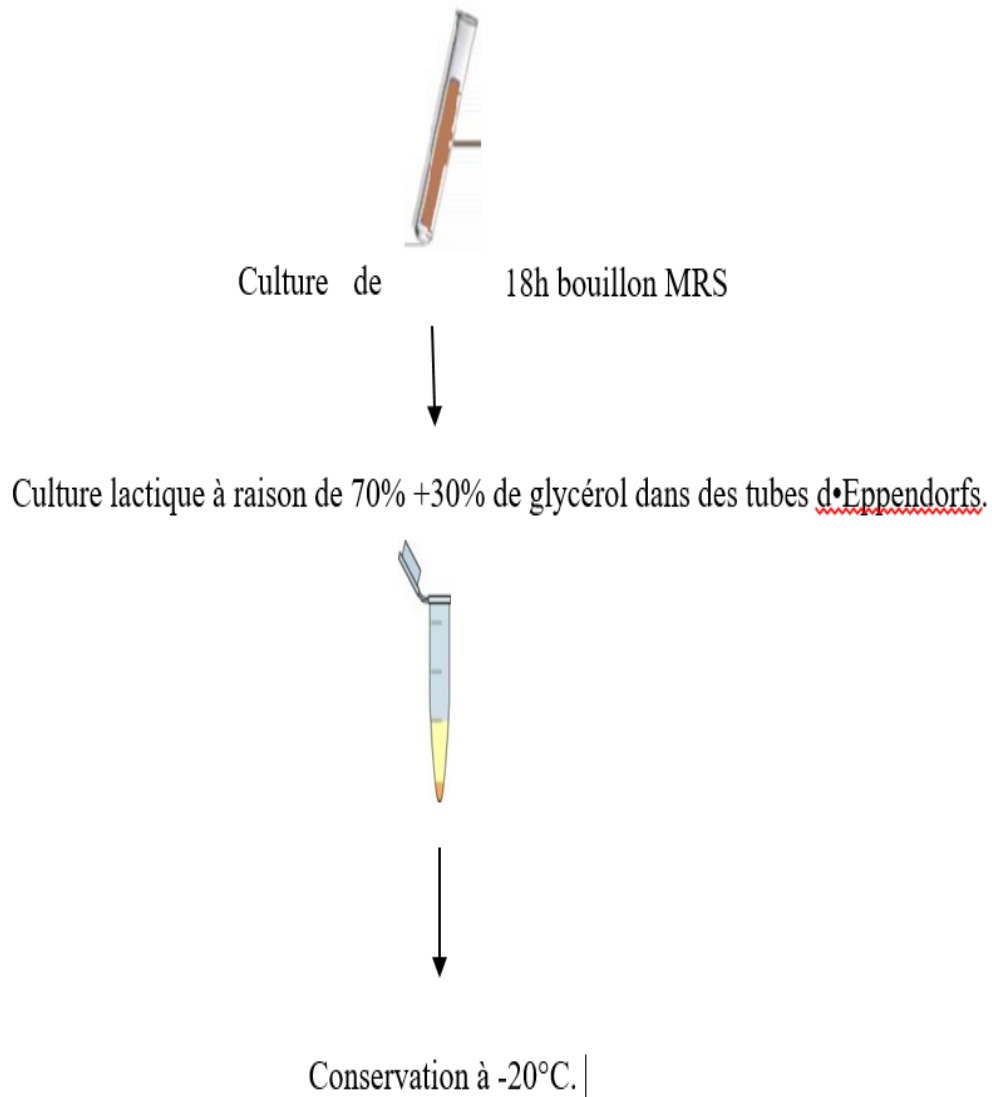
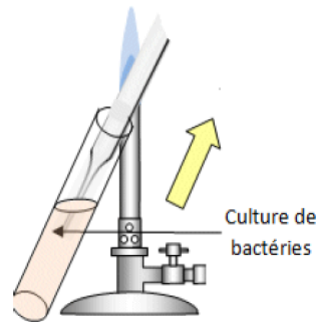


Figure 17: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Badis et al., 2005).

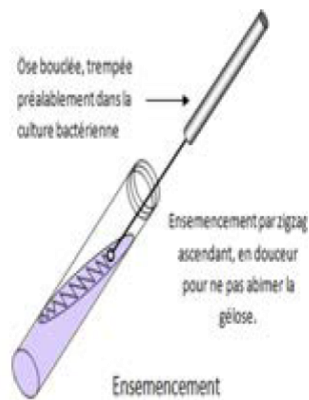
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

III.2.3.2 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**)(**Fig. 18**).



Prélèvement de l'inoculum



Incubation a 30°/24h



Conservation à 4°C/4semaines.

Figure 18: Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (**Badis et al., 2003**).

III.3 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 :

III.3.1 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 (Gerbaldo et al., 2012).

III.3.2 Test qualitatif : Méthode de confrontation directe :

Dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA, deux disques de 10 mm de diamètre constitués par l'inoculum de pathogène et celui de l'antagoniste ont été placés à 60 mm l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte. Pour le témoin, un disque mycélien du pathogène a été déposé dans un autre boit.

Après incubation Cinque jours à 25°C et à l'obscurité (Hibar et al., 2005).

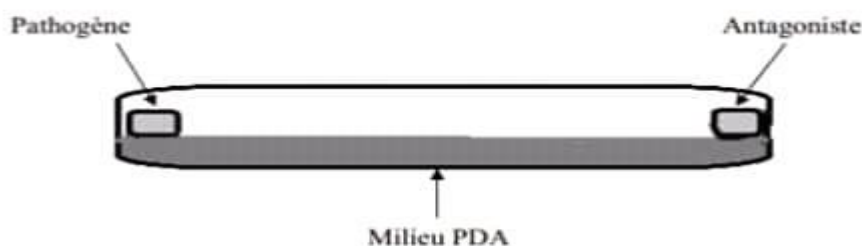


Figure 19: Confrontation directe entre le pathogène et l'antagoniste sur milieu PDA.

III.3.3 Test qualitatif : Méthode de confrontation à distance :

Le principe de cette méthode repose sur la technique déjà utilisée par (Camporta, 1985). Il consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées. Ensuite, un assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes, l'agent antagoniste en bas et l'agent pathogène en haut (fig.20). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. On expose ainsi l'isolat de l'agent antagoniste à l'influence des substances volatiles émises par la souche de l'agent pathogène.

Le témoin est formé par superposition des deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de l'agent pathogène alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA (Annexe3). Les boîtes sont soumises pendant 7 jours à une température de (25°C).

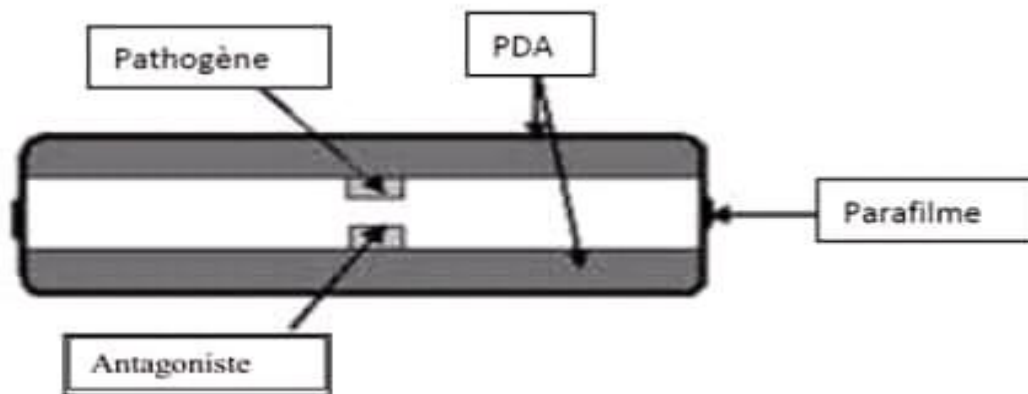


Figure 20: Confrontation à distance entre le pathogène et l'antagoniste sur milieu PDA.

III.3.4 Test qualitatif : Méthode des stries :

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode de double ou de recouvrement décrite par (Magnusson et al., 2003) a été utilisée. Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries sur MRS, puis incubés à 30°C pendant 48h. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar (0.7% d'agar) contenant 0.1 ml de suspension monosporale (10^3 spores / ml).

Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour des stries de bactéries selon les critères suivants : (-) : absence de zone d'inhibition ; (+) : zone d'inhibition compris entre 0.1 à 3 % de la surface de la boîte de pétri ; (++) : zone d'inhibition compris entre 3 à 8 % de la surface de la boîte de pétri ; (+++) : zone d'inhibition supérieure à 8 % de la surface de la boîte de pétri. Les tests d'inhibition ont été réalisés en triplicat (**Magnusson et al., 2003**).

III.3.5 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.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

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 Pétri 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).(Fig. 22).

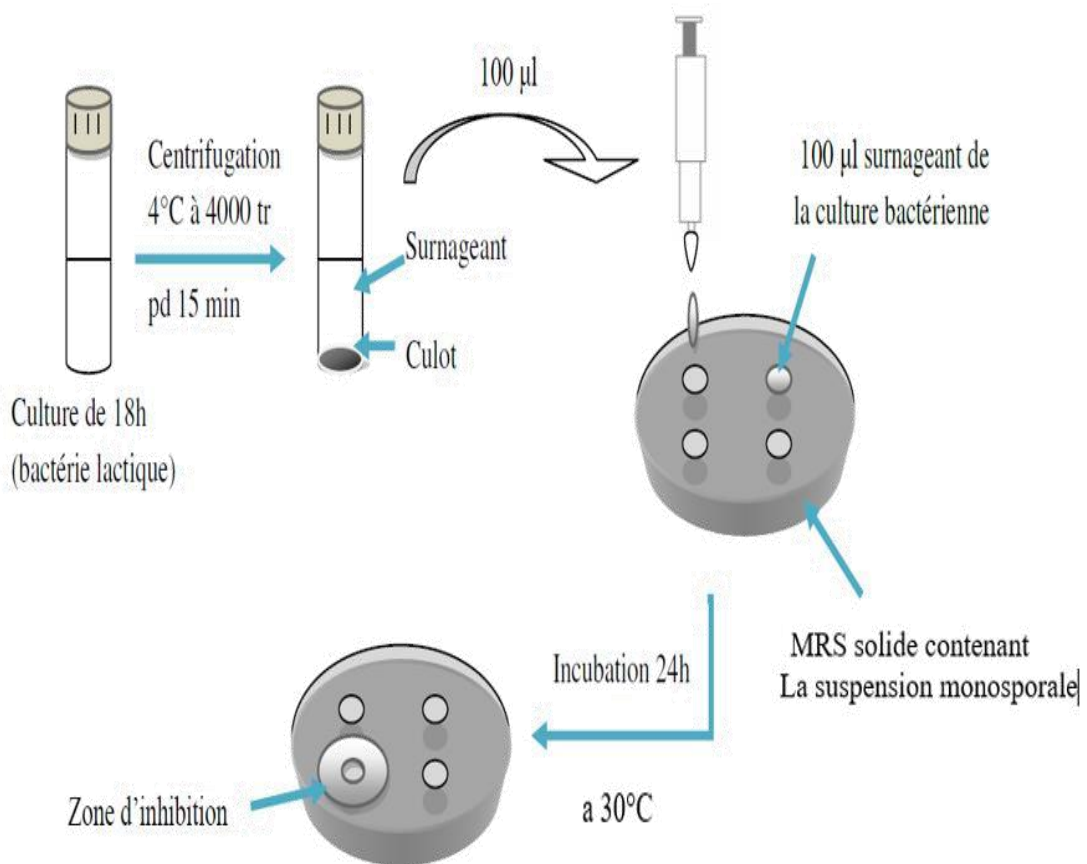


Figure 21: Les différentes méthodes utilisées pour la recherche de substances antimicrobiennes.

Chapitre III :

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

Vue la situation actuelle de la pandémie de nouvelles instructions (COVID-19) on n'a pas terminé notre travail dans le laboratoire pour pouvoir obtenir les résultats finaux, donc on s'est fixé des perspectives pour les résultats qui ne sont pas les nôtres et on a fait des comparaisons par rapport à d'autres travaux scientifiques qui ont le même objectif de notre travail.

I. Les souches fongiques :

I.1 Isolement et purification d'*Alternaria sp* :

I.1.1 Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques des isolats

d'*Alternaria sp* :

Trente-quatre (34) isolats d'*Alternaria sp*. Ont été prélevés dans différentes localités de la Wilaya de Mostaganem, Les isolements réalisés à partir de fragment foliaires ont confirmé la présence du champignon responsable de l'Altarnariose c'est -à -dire *Alternaria sp*. (Thalle filamenteux, ramifié et cloisonné, conidies pluricellulaires, isolées et avec long becs à l'extrémité). La collection est représentée par 29 souches purifiées de l'*Alternaria sp*.

Deux isolats d'*Alternaria sp* de différentes origines ont été observés pour une caractérisation morphologique des colonies sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les caractères cultureux des isolats d'*Alternaria* sur milieu PDA sont présentés dans le (Tab. 03).

Tableau 3: Caractères cultureux des isolats d'*Alternaria sp*. Sur milieu PDA.

Souche	Type	Couleur	Bordures	Couleur de l'envers	Sporulation
Ctt.f. (Ps)	Duveteux, avec une croissance cotonneuse	Vert foncé olivâtre	Périphérie légèrement irrégulière de couleur claire avec des anneaux concentriques.	Noirâtre	Sporulation important
T.F.é.2	Cotonneux, subaérien	Vert olivâtre avec une surface grisâtre	Périphérie légèrement irrégulière de couleur claire	Grise foncé avec une marge gris claire	Sporulation importante

Chapitre III : Résultats et discussion

- **Ctt.f. (Ps)** : Carotte fruit la partie supérieure.
- **T.F.é.2** : Tomate fruit échantillon 2.

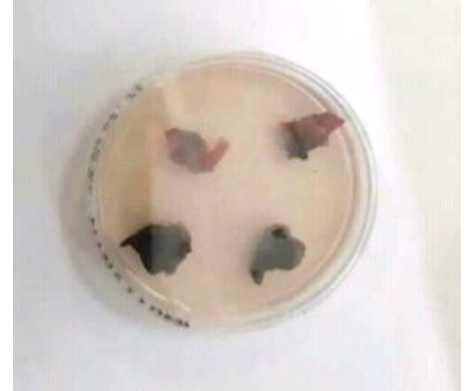


Figure 22: Isolat purifié de la tomate.

Chapitre III : Résultats et discussion



Figure 23: Isolat purifié de la carotte.

Ces observations sont en accord avec ceux de (Rai et Kumari et al., 2009) ont observé différents isolats d'*Alternaria Sp.* (**fig.24**).

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 régulières ou irrégulières, avec ou sans zones concentriques (**fig.24**).

Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats d'isolement après purification devraient normalement obtenue comme suite :

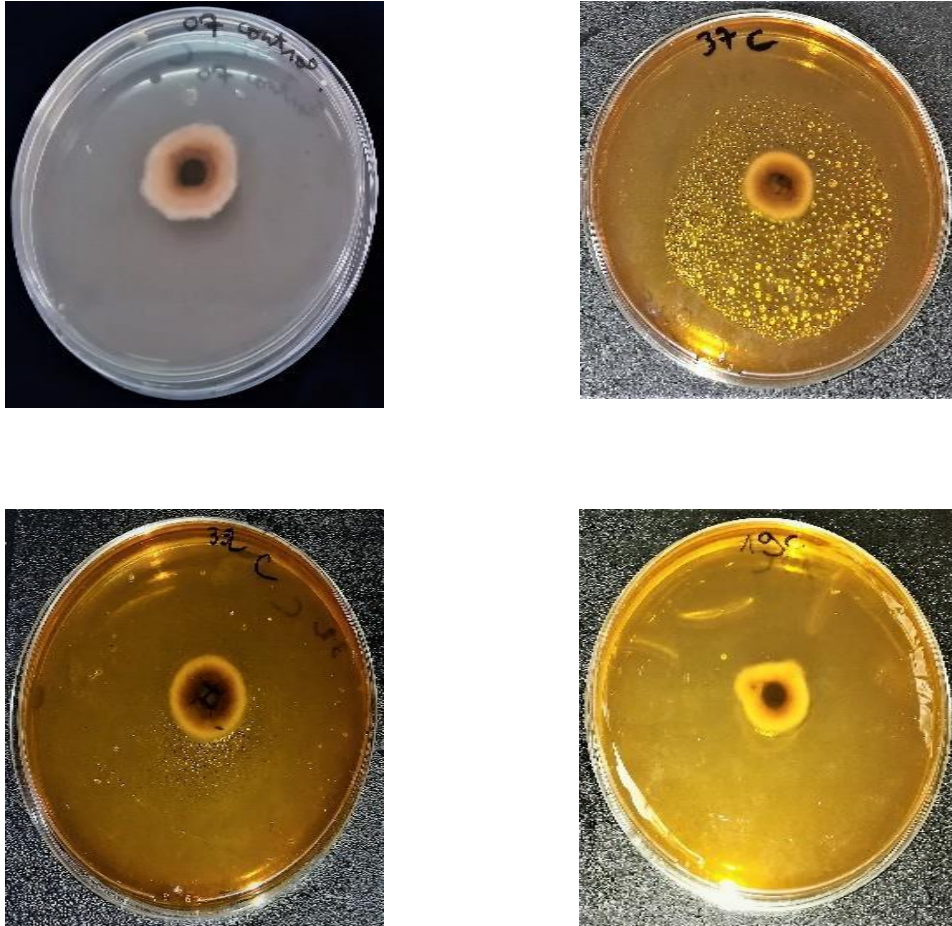


Figure 24: Evaluation des caractères morphologique microscopique *Alternaria Sp.*

Chapitre III : Résultats et discussion

I.1.2 Evaluation des caractères morphologiques microscopiques des isolats d'*Alternaria sp* :

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques de différentes souches étudiées.

L'*Alternaria sp* se présente sous la forme de long filaments (hyphes) le mycélium est de type cloisonné associé à la présence de conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.

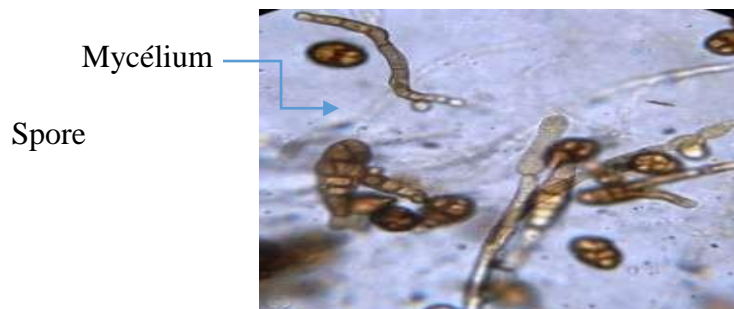
Ces observations sont en accord avec ceux de (Botton et al, 1990), (Barnett et al., 1972) ont observé différents isolats d'*Alternaria Sp*. (Tab.04).

Tableau 4: Caractéristiques morphologiques d'*Alternaria sp*.

Genres et espèces	Colonies	Mycélium (hyphe)	Conidies et Spores	Référence bibliographique
<i>Alternaria, sp</i>	Thalle noir	Cloisonné	conidies en chaînes simples ou ramifiées, brunes, irrégulières, 20-80 x 9-18µm, plus souvent avec un rostre apical court mais bien différencié (Fig.25et 26)	(Botton et al., 1990) (Barnett et al., 1972)



(Grossissement : x 400)



(Grossissement : x 1000)

Figure 25: Observation d'*Alternaria Sp*. Sur microscope.

Chapitre III : Résultats et discussion

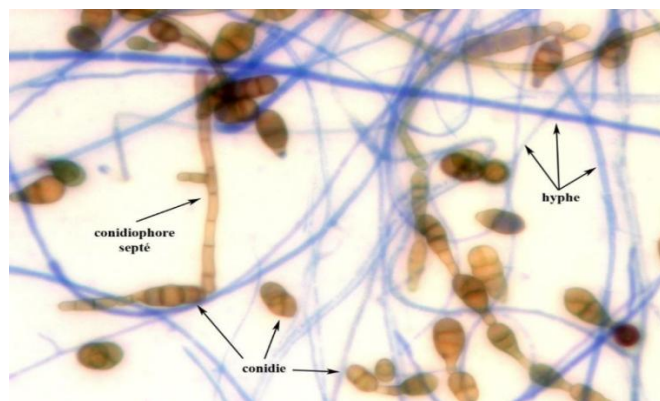


Figure 26: Schéma explicative d'un champignon *Alternaria Sp.* (Botton et al., 1990).

I.2 La culture monospore :

Après 24 h d'incubation à 25°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, nous avons procédé au repérage et à la délimitation des spores en germination.

Trois à quatre conidies que ont été déposées dans une boîte de pétri contenant du milieu PDA. Après incubation, de cultures pures sont obtenues, dans le cas contraire, une autre culture monospore peut être réalisée à partir des cultures obtenues.

Ces résultats sont en accord avec la recherche de (Rappily, 1968) qui ont observé sur des différents isolats d'*Alternaria sp.*

II. Les bactéries lactiques :

II.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).

II.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.

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, mais les bâtonnets présents des cellules associées en paires ou en courtes chaînettes.

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

Chapitre III : Résultats et discussion

aspects microscopiques.

D'après la recherche qui établies par (Badis et al., 2005). Les résultats sont en accord avec notre recherche qui a observé sur des différents isolats d'*Alternaria Sp.* (Fig.27).

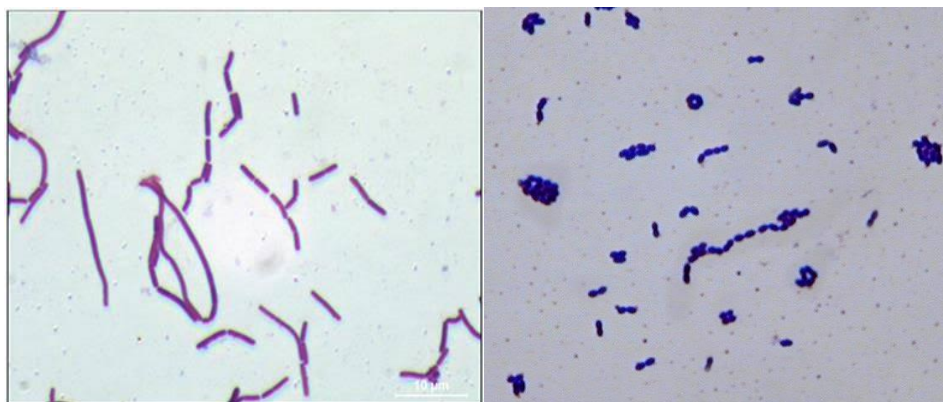


Figure 27: Observation microscopique de la souche *Lactobacillus plantarum* (A) et *Enterococcus sp* (B) après coloration de Gram (G x100).

II.1.2 Tests physiologiques :

II.1.2.1 Test de la catalase

Les bactéries lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O₂) elles sont dites catalase négatives.

Les résultats obtenues sont similaire avec les résultats qui sont fait par (Marchal et al., 1991)(fig.28).

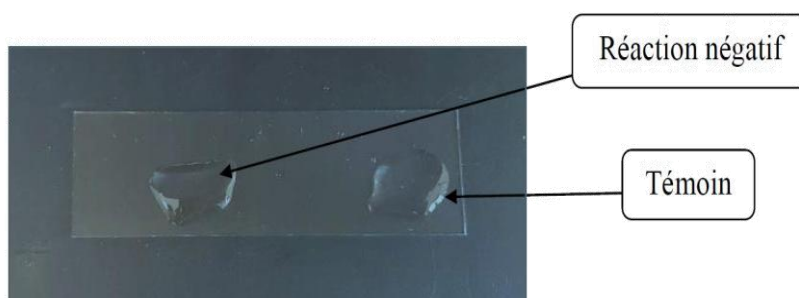


Figure 28: Résultat de test de la catalase.

II.2 La recherche de l'activité antifongique :

La lutte biologique contre les souches fongiques, fait largement de test l'antagonisme. L'efficacité de la lutte dépend du choix de souche antagonisme performantes à partir de critères impliquant une bonne croissance des particularités biologique du matériel fongique utilisé.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.2.1 Méthode de confrontation :

La production de substances antifongiques envers *Alternaria Sp.* a été recherchée par la méthode de confrontation (méthode des stries), les bactéries lactiques, isolées du lait de chamelle et lait chèvre et lait de vache. Les résultats ont montré que tous les souches présentaient une activité antifongique sont des 2souches d'*Eterococcus facium* et souche *lactobacillus plantarum*. Toutes les souches ont montré une inhibition totale.

Nos résultats sont en accord avec (Gerbaldo et al., 2012) qui a utilisé la même méthode et avoir le même résultat.

II.2.1.1 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.

Une activité antifongique a été détectée par le surnageant de certain souches .

II.2.1.2 La Méthode de confrontation directe :

Les résultats de la confrontation directe vis-à-vis les bactéries lactiques Contre les champignons phytopathogènes (d'*Altarnaria sp*) testés n'ont monté que les bactéries lactiques inhibe la croissance mycélienne de mycètes testés.

Ces résultats est semblable à ceux obtenus par (Muhialdin et Hassan, 2011). La croissance mycélienne a été inhibée en confrontation directe, et aucune formation de conidies n'a été observée sur le mycélium.

II.2.1.3 La Méthode de confrontation à distance :

Malgré l'absence d'un contact direct entre l'agent pathogène testés et les agents antagonistes. Ce dernier a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies d'*Altarnaria sp.* Ceci s'expliquerait par l'aptitude des agents antagonistes à produire des substances volatiles qui provoqueraient la lyse du mycélium et des spores du pathogène et capable de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

Ces résultats est semblable à ceux obtenus par (Hibar et al., 2005).

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 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 bio préservation qui constitue une approche très prometteuse (Stile, 1996 ; Magnusson et Schnürer, 2001 ; Kim, 2005).

Dans cette étude, nous avons étudié les propriétés antifongiques d'une souche d'*Eterococcus facium* et une souche de *Lactobacillus Plantarum* isolées du lait cru de chamelle et lait de chèvre et vache . 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).

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

L'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été significativement différent d'une souche à l'autre.

Ces observations sont en accord avec ceux de (Rai et Kumari et al.,2009) ont observé différents effets sur isolats d'*Alternaria Sp.*

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 la souches bactériennes (35) vis-à-vis le champignon 37.(Fig.29).

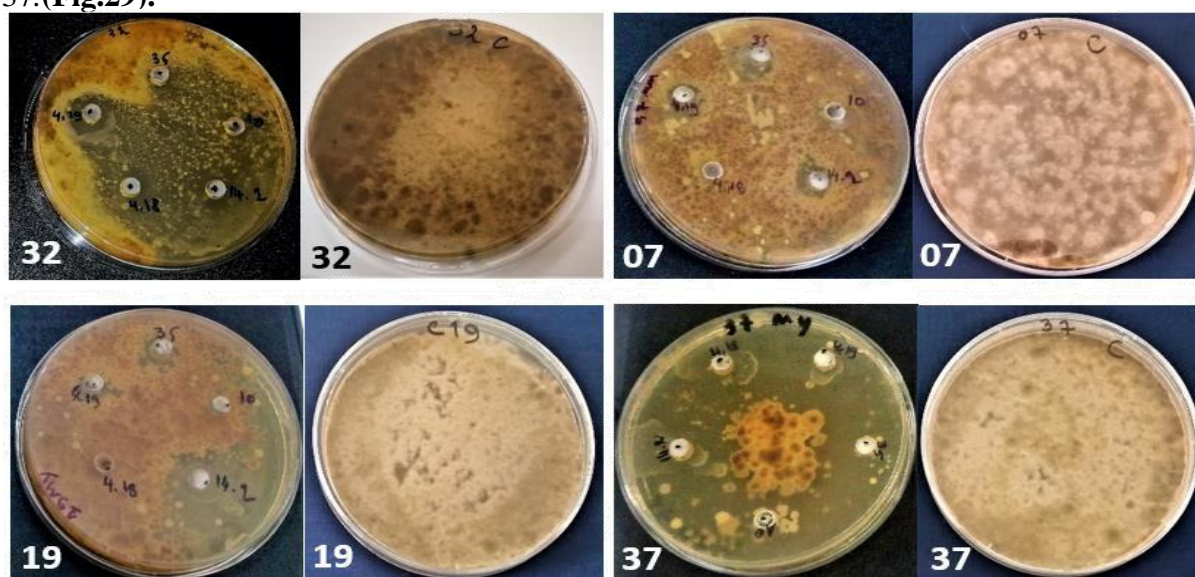


Figure 29: Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les champignons phytopathogènes.

Chapitre III : Résultats et discussion

Un effet fortement inhibiteur de la bactérie *Enterococcus faecium* qui ont donné un pourcentage d'inhibition entre 82 et 100% vis-à-vis les champignons et un effet modéré pour le champignon 07 à un pourcentage de 22%.(Fig. 30).

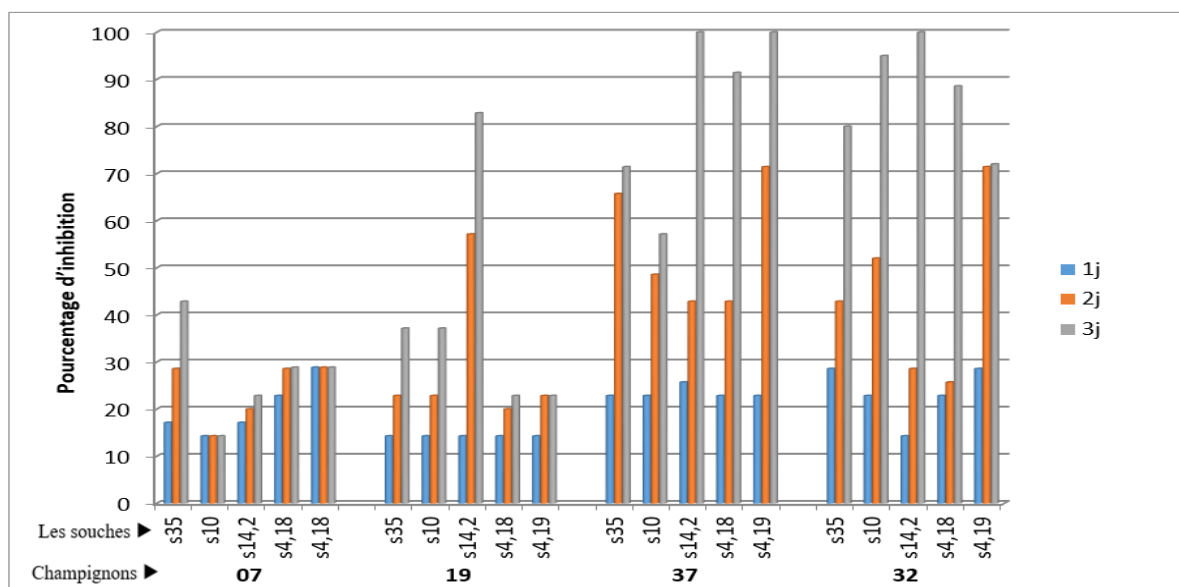


Figure 30: Pourcentage d'inhibition d'*Aalternaria sp.* Par les métabolites des *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecium*.

Dont les colonies inhibaient des champignons du genre *Alternaria sp.*, 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 il y'a souches font parties de la même espèce, il appert que l'activité inhibitrice était souche-dépendante.

La souche de *Lb. plantarum* a 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.

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

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la production de nombreux aliments fermentés. Grace à leurs propriétés fermentaires, ainsi qu'à leur capacité de survivre et de se développer dans diverses conditions environnementales, elles prolongent la durée de conservation des produits. En outre, les peptides antimicrobiens « bactériocines », produits par ces bactéries et doués d'activités inhibitrices dirigées notamment contre plusieurs pathogènes des aliments renforcent cette propriété de bio-conservation. Ces bactériocines permettent en effet de lutter efficacement contre les différentes bactéries indésirables, pathogènes, d'altération ou résistantes aux antibiotiques. A ce jour, vu la rigidité des lois réglementant la mise sur le marché d'une substance destinée, Néanmoins, l'utilisation de souches productrices de bactériocines, notamment les bactéries lactiques, qui jouissent du statut GRAS, est très prometteuse.

La présente étude a pour objectif de prévenir la croissance d'*Alternaria Sp* par l'utilisation des bactéries lactiques, dont l'activité antibactérienne et l'innocuité est largement décrite. L'activité antagoniste d'une souche de *Enterococcus faecium*, et une souche *Lactobacillus plantarum* isolés du lait de chamelle et lait de chèvre et vache vis-à-vis d'*Alternaria sp*. Par la méthode de confrontation, a démontré une bonne inhibition fongique, ces résultats sont similaires avec celles détectées sur le surnageant selon la méthode des puits.

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique des bactéries lactique ont mis des deux souches représentants d'une souche *Lactobacillus plantarum* et une souche *Enterococcus faecium*.

Le résultat de l'examen macroscopique et microscopique de champignon pathogène a mis en évidence de l'espèce d'*Altarnaria sp*. Dans la plante de tomate et la carotte, qui est responsable de la maladie d'Altarnariose.

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. 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 bio préservation, il serait intéressant d'élargir la gamme des

Conclusion

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.

Les perspectives de recherche consisteraient à :

- Identification moléculaire de la souche pathogène.
- Elargir les zones et le nombre des échantillons dans régions de la Wilaya de Mostaganem.
- Affiner les méthodes d'isolement des champignons pathogène pour récupérer le maximum d'isolat.
- Fait utilisée dans le domaine de la lutte biologique.
- Recherche d'autre souche de bactérie lactique intéressante.
- Tester le pouvoir antagoniste des bactéries lactiques in vivo en utilisant une plante hôte.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Agrios, GN. (2005).** Plant pathology. 5th Ed. Elsevier, London. 922: 455.
- **Amsellem, Z., Zidack, NK., Quimby, PC., Gressel, JrJ. (1999).** Long-term dry.
- **Andersen, B., Frisvad, JC. (2004).** Natural occurrence of fungi and fungal Application. In: DeVuyst L, Vandamme E J. , editors; De Vuyst L, Vandamme E J. , editors. Bacteriocins of lacticacidbacteria. Glasgow, United Kingdom: Blackie A and P. pp. 151–221.
- **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.
- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Curr Microbiol.*39: 43-48.
- **Baker, KE., Cook, RJ. (1974).** Biological control of plant pathogens, Freeman, San Fransisco.
- **Barnett. H.L., et Barry .B., Hunter. (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi. 209P.
- **Bassadat, L., nabahat, R. (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 innine 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.
- **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 polygalacturon doctorat. Université De Mentouri Constantine.
- **Belabid, L. (2003).** La fusariose vasculaire de la lentille (*lens culinaris* Med.) Bergey''s Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- **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.
- **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.

Références bibliographiques

- **Boedo, C. (2006).** Caractérisation des étapes précoces de la brûlure foliaire due à *Alternaria dauci*, chez une variété de carotte sensible et une variété tolérante à la maladie mémoire de Master.
- **Booth, C. (1971).** The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237p.
- **Botton, B., Bretton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph., Larpent, JP., Reymond, E., Sanglier, JJ., Vayssier, Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2eme edition. Paris. 512: 309.
- **Botton, B., Bretton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph., Larpent, JP., Reymond, P., Bourgeoi. et Larpent, J.P. (1996).** S, C.M Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.
- **Carillo, L. (2002).** Los hongos de los Alimentos y forrajes : *Alternaria*.
- **Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- **Champion, R. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. Editions INRA, Paris. 391 pp.
- **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.
- **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.
- **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.*
- **Dortu, C., Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13:143-154 .
- **Dworkin, I., Gibson, G. (2006).** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wingshape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 1417–1431.
- **Ellis, MB., Gibson, IAS. (1975).** *Alternaria solani* no. 45 sets 48. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. *engineering*. 37: 1-20.
- **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.
- **Farrar, J. J., Pryor, B. M., Davis, R. M. (2004).** *Alternaria* diseases of carrot. *Plant disease*. 88 : 776-784.
- **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.
- **Fuller, R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.* 66:365-378.
- **Grogan, RG., Kimble, KA., Misaghi, I. (1975).** A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology*. 65: 880-886.

Références bibliographiques

- **Hadef, S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université KasdiMerbah Ouargla.
- **Hardie J.M. (1986).** Otherstreptococci. 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.
- **Harold, Ph., Eddleman, D. (February 1998).** "Making Bacteria Media from Potato". Indiana Biolab. disknet.com. Retrieved 2011-03-04.
- **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.
- **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., Holzappel, W.H., Franz, C.M., Ludwig, W. and Dicks L.M.T. (2006).** 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. *Fod Control.*, 22: 401-407.
- **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.
- **Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthelemy, LP., Thonart, P. (2013).** *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: properties, biosynthesis, fermentation.
- **Kim, D.W., Chater, K., Lee K.J., and Hesketh D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187(9)**, 2957-2966.
- **Langella, P., Nouillale, S., Commissaire, J., Bolotine, A., Gruss et le Loir Y. (2001).** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 19-28. Stiles, M. E., and Holzappel, 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.
- **Laurent Federighi M., Jouve J L. (1998).** Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p.
- **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.
- **Lepoivre, P. (2003).** Phytopathologie. De Boeck et Lancier, Bruxelles. 427: 320.
- **Leveau, J.Y. et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.

Références bibliographiques

- **Linan, MD., Morassin, P., Recco, F. (1999).** Actualités sur *Alternaria*: écologie, Revue Française d'allergologie. 349- 355.
- **Lopes, CA., Boiteux, LS. (1994).** Leaf spot and stem blight of sweet potato caused by *Alternaria bataticola*; à new record to South America. Plant disease. 78: 1107-1109.
- **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*.
- **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.
- **Mayra-Makinen, 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.
- **Muhaladin, 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, 85-90. 57.
- **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.
- **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, 267-27.
- **Ongena, M., Jacques, P. (2008).** *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16: 115- 125.
- **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.
- **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.
- **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.

Références bibliographiques

- **Patterson, C. L. (1991).** Importance of chlamyospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight of tomato. *Plant Disease*. 75: 274-278.
- **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.
- **Peron, j-y, (2006).** Production légumières. Edition La voisier, 2^{ème} édition. Page 198-205.
- **Pilet, M.F., Magras, C., et Federighi, M. (1998).** Bactéries lactiques. In : *Manuel de bactériologie alimentaire* (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.
- **Rappily, F. (1968).** les techniques en mycologie en pathologie végétal. *Annales des Epiphytes*, vol.19. Institut National de Recherche Agronomique, Paris (France), 12p.
- **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.
- **Rotem, J. (1994).** The genus *Alternaria*, biology and pathogenicity. APS Press, St.
- **Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz J., et Zoon P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International*.
- **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.). 3^e 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.
- **Sandrock, RW., Vanetten, HD. (1998).** Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology*. 88: 137-143.
- **Sanglier, JJ., Vayssier, Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle 2^{ème} édition. Paris. 512 :309.
- **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.

Références bibliographiques

- **Sherf, AF., MacNab, AA. (1986).** Vegetable diseases and their control. Wiley, New York.
- **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.
special reference to induced systemic resistance in plant. Microbiol Res. 164: 493- 513.
- **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. Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, Applied and Environmental Microbiology, 67, 1-5.
- **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.
- **Strandberg, J. O. (1983).** Infection and colonization of inflorescence and mericarps of carrot by *Alternaria dauci*. Plant Disease. 67 : 1351-1353.
- **Strandberg, J. O. (1987).** Isolation, storage and inoculum production methods for *Alternaria dauciphytopathology*. 77 : 1008-1012.
- **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.
- **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.
- **Trail, F., Koller, 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.
- **Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, 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. (2002)** 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.

Références bibliographiques

- **Yao, C., Koller, 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.
- **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

Annexes

Eau distillée..... 1000 ml

Agar.....15

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

Code des souches lactiques :

Les souches	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Eterococcus facium</i>
Code	4.18	35