



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : BOURAHLA Mahdi

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE: SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION: PROTECTION DES VEGETAUX ET D'ENVIRONNEMENT

Thème

Détermination *in vitro* de pouvoir antagoniste d'*Enterococcus faecium* vis-à-vis des champignons phytopathogènes

Jury de soutenance :

M^{elle}. Ameer Dj.
M. Gacem M.A.
M. Houicher A.

MAA
MAB
MCB

Présidente
Examineur
Rapporteur

Promotion : Juin 20



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

RESUME DE MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Sciences Agronomiques

Option: Protection des Végétaux et Environnement

Thème: Détermination *in vitro* de pouvoir antagoniste d'*Enterococcus faecium* vis-à-vis des champignons phytopathogènes

Présenté par: BOURAHLA Mahdi

Encadré par: M. Houicher A.

Résumé:

L'*Enterococcus faecium* est une bactérie à Gram positif, ubiquiste, se trouve sur les plantes, dans le sol et dans plusieurs produits alimentaires artisanaux. Elle est capable de survivre à haute température et dans des conditions environnementales défavorables. Pour cela, le présent travail a pour objectif d'étudier le pouvoir antagoniste des souches d'*Enterococcus faecium* isolées à partir de rhizosphère des oliviers vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

L'étude phénotypique a permis d'identifier 20 isolats *Enterococcus faecium* avec une prédominance de 80%, 4 isolats de *Streptococcus uberis* (16%) et un isolat d'*Enterococcus durans* qui représente 4 % du total des bactéries isolées. Huit souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antifongique par la méthode des stries dont 6 d'entre elles se sont des *Enterococcus faecium*. Toutes les souches d'entérocoques testées ont inhibé totalement la croissance de *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* et *Penicilium citrinum*. Par contre, aucune activité antifongique n'a été détectée pour les souches d'*E. faecium* (I 24 et I 29) et de *S. uberis* (I 19 et I 21) sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et d'*A. parasiticus*.

Sur la base de ces résultats, il peut être suggéré l'identification des composés antifongiques produits par les entérocoques et leur mécanisme d'action afin d'ajouter un nouveau outil prometteur au biocontrôle des maladies fongiques.

Mots clés: *Enterococcus faecium*, Rhizosphère, Champignon, Activité antifongique, Lutte biologique.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

RESUME DE MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences agronomiques

Option : Protection des végétaux et environnement

Theme: *In vitro* antagonism determination of *Enterococcus faecium* against phytopathogenic fungi

Présenté par BOURAHLA Mahdi

Encadré par: M. Houicher A.

Abstract:

Enterococcus faecium is a Gram positive bacterium, ubiquitous, commonly found in plants, soil and several artisan food products. It is able to survive under high temperatures and adverse environmental conditions. Therefore, the present work aims to study the antagonism properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from rhizosphere of olive plants against pathogenic fungi.

The phenotypic study identified 20 *Enterococcus faecium* isolates with a predominance of 80%, 4 isolates of *Streptococcus uberis* (16%) and one isolate of *Enterococcus durans* representing 4% of total bacteria isolated. Eight strains were selected for the study of the antifungal activity by the method of streaking which 6 of them are *Enterococcus faecium*. All strains of enterococci tested completely inhibited the growth of *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Penicillium citrinum*. However, no antifungal activity was detected for *E. faecium* (I 24 and I 29) and *S. uberis* (I 19 and I 21) strains on the growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*.

Our findings suggested the characterisation of antifungal compounds produced by enterococci and their mechanism of action in order to add a promising new tool in the biocontrol of fungal diseases.

Key words: *Enterococcus faecium*, Rhizosphere, Fungi, Antifungal activity, Biological control.



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة عمار ثليجي – الأغواط



كلية العلوم
قسم علوم الفلاحة
ملخص مذكرة الماستر

ميدان: علوم الطبيعة والحياة

شعبة: علوم الفلاحة

تخصص: حماية النباتات والبيئة

عنوان المذكرة:

تحديد في المختبر لقدرة الرد العكسي لـ *Enterococcus faecium* تجاه بعض الفطريات المسببة
لأمراض النبات

تقديم الطالب: بورحلة مهدي

الأستاذ المؤطر: السيد: هويشر ع.

ملخص المذكرة :

Enterococcus faecium هي نوع من البكتيريا موجبة الجرام، توجد في العديد من الأماكن، على النباتات، في التربة، وفي عديد المنتجات الغذائية المصنعة. هذه البكتيريا قادرة على البقاء على قيد الحياة في درجات حرارة عالية وتحت ظروف بيئية غير مناسبة. لذا يهدف هذا العمل إلى دراسة قوة الرد العكسي لسلاسلات من *Enterococcus faecium* معزولة من منطقة الجذور لأشجار الزيتون تجاه الفطريات المسببة للأمراض النباتية.

حددت الدراسة المظهرية هوية 20 عزلة *Enterococcus faecium* بنسبة سيطرة تقدر بـ 80%، 4 عزلات *Streptococcus uberis* (16%)، و عزلة واحدة *Enterococcus durans* التي تمثل 4% من المجموع. تم اختيار ثمانية سلاسلات لدراسة النشاط المضاد للفطريات من خلال طريقة الاشرطية، ستة منها *Enterococcus faecium*. جميع سلاسلات *Enterococcus* منعت كليا نمو كل من *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum*، بالمقابل لم يتم الكشف عن أي نشاط مضاد للفطريات لعزلات *E. faecium* (I 24, I29) و بالنسبة لعزلات *S. uberis* (I 19, I21) على نمو *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*. وبناء على هذه النتائج، فإنه يمكن اقتراح تحديد المركبات المضادة للفطريات التي تنتجها *Enterococcus* وآلية عملها من أجل إضافة أداة واعدة للمكافحة البيولوجية للأمراض الفطرية.

الكلمات المفتاحية: *Enterococcus faecium*، منطقة الجذور، الفطريات، النشاط المضاد للفطريات، مكافحة البيولوجية.

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la patience afin de réaliser ce modeste travail, au terme duquel, il m'est un agréable devoir de formuler mes vifs remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ma formation tant morale qu'intellectuelle.

Mes vifs remerciements s'adressent tout d'abord à mon encadreur monsieur Houicher Abderrahmane qui a fait preuve d'une grande volonté en assurant l'encadrement de ce travail avec un grand effort en dépit de son temps fort chargé et de ses multiples occupations.

Je remercie tous les membres de jury qui doivent avoir l'acceptation de me examiner.

Vos remarques pertinents sur le contenu m'ont permis d'améliorer la qualité de ce document.

Je remercie les professeurs qui m'ont enseigné et accompagné dans mes études.

Je remercie tous mes amis et collègues qui m'ont aidé

Je voudrais aussi adresser un grand merci pour toutes les personnes

qui, à des titres divers, ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Bourahla Mahdi

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents pour leurs sacrifices et encouragements durons toute ma carrière comme étudiants

A toute ma famille

A tous mes amis sans exception

A tous mes collègues de l'université

A tous les personnes qui de près et de loin m'ont apporté leur aide

Bourahla Mahdi

Sommaire

Résumé	I
Abstract	II
ملخص المذكرة	III
Liste des abréviations	VIII
Liste des tableaux	IX
Liste des figures	X
Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
I. Les Entérocoques	3
I.1. Introduction.....	3
I.2. Taxonomie.....	3
I.3. Caractéristiques	4
I.4. Habitat.....	7
I.5. Résistance à des antibiotiques.....	7
I.6. Les métabolites secondaires et les bactériocines (entérocoques) produites par les entérocoques	8
I.6.1. Les métabolites secondaires.....	8
I.6.2. Les bactériocines.....	9
I.7. <i>Enterococcus faecium</i>	10
II. Les champignons phytopathogènes.....	12
II.1. Moisissures des céréales.....	12
II.1.1. Les champignons de champs.....	13
II.1.2. Les champignons de stockage.....	13
II.2. Moisissures des légumes secs.....	14
II.2.1. La flore du champ.....	14
II.2.2. La flore intermédiaire.....	14

II.2.3. La flore de stockage.....	14
II.3. Aliments composés pour les animaux.....	15
II.4. Autres végétaux.....	15
III. La lutte biologique	16
III.1. Les inconvénients de la lutte chimique.....	16
III.2. La lutte biologique.....	17
III.2.1. Généralités.....	17
III.2.2. L'intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes.....	18
III.3. Les agents de lutte biologique les plus utilisés contre les microorganismes phytopathogènes.....	20
III.3.1. Les champignons.....	20
III.3.2. Les bactéries.....	20
III.3.3. Les extraits de plantes.....	21
III.4. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique.....	21
III.4.1. Définition de l'antagonisme.....	21
III.4.2. Les mécanismes d'action	22
III.4.2.1. Antibiose.....	22
III.4.2.2. Compétition.....	23
III.4.2.3. Parasitisme.....	23
III.4.2.4. Induction des systèmes de résistance de la plante hôte.....	24
III.4.2.5. Diminution de l'agressivité du pathogène.....	25
III.5. Utilisation des entérocoques en lutte biologique.....	26
Matériels et méthodes.....	27
1. L'échantillonnage.....	27
2. Isolement et purification des Entérocoques.....	27
3. Conservation des isolats.....	27
4. Caractéristiques phénotypiques des souches.....	28

4.1. Etude morphologique.....	28
4.2. Etude physiologique et biochimique.....	28
4.2.1. Le test de catalase.....	28
4.2.2. Test de l'hydrolyse d'esculine.....	28
4.2.3. Croissance à pH 9.6.....	28
4.2.4. Croissance en présence de 6.5% de NaCl.....	29
4.2.5. Galerie biochimique miniaturisée.....	29
5. Recherche de l'activité antifongique.....	30
5.1. Matériel fongique.....	30
5.2. Préparation des suspensions fongiques.....	30
5.2. Méthode des stries.....	31
Résultats et discussion.....	33
1. Isolement et identification des entérocoques.....	33
1.1. Isolement et purification.....	33
1.2. Identification phénotypique des souches.....	33
2. Activité antifongique.....	37
Conclusion.....	41
Références bibliographiques.....	42
ANNEXES.....	56

Liste des abréviations

ADH : Dégradation de L-arginine

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

ARNt: ARN de transfert

AW : Activité d'eau

BHIA: Brain Heart Infusion Agar

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CO₂: dioxyde de carbone

ESA : Enterococcus Selective Agar

ESC: Hydrolyse d'Esculine

FAO: Food and Agriculture Organization

GLYG : Fermentation de Glycogène

H₂O₂ : Eau oxygénée

HCl : Acide chlorhydrique

KOH :Hydroxyde de Potassium

LAP : Teste de L-leucine-β-naphtylamide

MRS : De Man, Ragosa, and Sharpe

NaCl: Chlorure de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAL:Teste de 2-naphtyl phosphate

PDA : Potato Dextrose Agar

pH: potentiel Hydrogène

PYRA : Activité de Pyrrolidonyl Arylamidase

RIB : Fermentation de D-ribose

Sp. : Espèce non précisée

Spp. : Plusieurs espèces non précisée

UFC: Unité formant colonie

UV : Ultra violette

α GAL : Activité de α -Galactosidase

β GAL : Activité de β -Galactosidase

Liste des tableaux

N°	Titre	page
Tableau 1	Les groupes de genre <i>Enterococcus</i> selon l'analyse de l'ARNr 16S (Aguilar-Galvez et al., 2012).....	4
Tableau 2	Classification des entérocoques (Franz et al., 2007).....	10
Tableau 3	Quelques agents antagonistes commercialisés sous forme de produits biologiques utilisés dans le traitement de certaines maladies phytopathogènes (Sabaratnam et Traquair, 2002; Jijakli, 2003; Punja et Utkhede, 2003).....	19
Tableau 4	Agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes (Errakhi, 2008).....	25
Tableau 5	Caractéristiques phénotypiques des isolats des entérocoques.....	36
Tableau 6	Résultats de l'activité antifongique des entérocoques.....	38

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	<i>Enterococcus</i> sp. observée en microscopie électronique	5
Figure 2	<i>Enterococcus faecium</i> en observation microscopique.....	11
Figure 3	Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> (Morin, 1994).....	12
Figure 4	Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode des stries (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007).....	31
Figure 5	Test de recherche de l'activité antifongique par la méthode des stries.....	32
Figure 6	Observation microscopique d' <i>Enterococcus faecium</i> après la coloration de Gram (grossissement : 1000 x).....	33
Figure 7	Gélose Esculine avant l'inoculation (Témoin).....	34
Figure 8	Gélose Esculine après l'inoculation (Réaction positive).....	34
Figure 9	Prévalence des entérocoques isolés de la rhizosphère des oliviers .	35
Figure 10	Activité antifongique d' <i>Enterococcus faecium</i> (I25) vis-à-vis <i>Penicillium expansum</i> (+++).....	39
Figure 11	Activité antifongique d' <i>Enterococcus faecium</i> (I 31) vis-à-vis <i>Aspergillus parasiticus</i> (++).....	39
Figure 12	Activité antifongique d' <i>Enterococcus faecium</i> (I25) vis-à-vis <i>Aspergillus flavus</i> (+).....	39
Figure 13	Activité antifongique d' <i>Enterococcus faecium</i> (I 30) vis-à-vis <i>Aspergillus parasiticus</i> (-).....	39
Figure 14	<i>Enterococcus durans</i> (Probabilité de 95%).....	56
Figure 15	<i>Streptococcus uberis</i> (Probabilité de 87%).....	56
Figure 16	<i>Enterococcus faecium</i> (Probabilité de 99%).....	56

Introduction

Introduction

Les plantes, comme tous les organismes vivants, subissent l'action de divers parasites. Qu'ils soient végétaux ou animaux, ces organismes nuisibles s'attaquent directement aux tissus des plantes (champignons, insectes...) ou ils leur font concurrence sur le plan des ressources (air, eau, éléments nutritifs du sol...) (Vincent, 2000). Les champignons pathogènes sont parmi les microorganismes les plus dangereux sur les cultures, ils sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées comme les mildious, les oïdiums, les rouilles, les fontes de semis, les caries, les charbons, les pourritures des fruits, et les maladies vasculaires (Lepoivre, 2003). Certains d'eux attaquent les fruits pendant le stockage où la plupart d'eux peuvent être développés sans l'existence d'humidité élevée, ces derniers appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Mikhael, 2000).

Pour diminuer les pertes de rendements occasionnés sur les plantes d'intérêt agricole, des méthodes de lutte classique comme l'utilisation de la résistance des plantes et l'application des pesticides sont déployés. Leurs limites d'efficacité sont maintenant connues. Elles sont dues en grande partie à l'absence éventuelle des sources végétales de résistances, aux difficultés d'application des pesticides par ailleurs potentiellement néfastes pour la santé humaine et l'environnement ainsi que l'induction à long terme de résistance au pathogène face à ces pesticides (Vanachter et al., 1983 ; Moenne-lopez et al., 1998). Parmi les alternatives à la lutte chimique, l'application de la protection biologique. Elle s'est avérée le moyen de lutte le plus respectueux pour l'environnement, parce qu'elle fait appel à des antagonistes naturels, et parce qu'elle met en jeu des mécanismes complexes difficiles à contourner par le parasite (Besnard et Davet, 1993). En comparaison avec la lutte chimique, la lutte biologique n'a qu'une efficacité relative et demande davantage de connaissances et d'observation, mais à long terme, elle est plus intéressante sur tous les plans (Whipps, 1997).

Parmi les agents possibles de lutte biologique certains bactéries comme : *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., les actinomycètes ; et certains champignons comme : *Trichoderma* spp. (Errakhi, 2008), qui semblent actuellement les plus intéressants et les plus étudiés ces dernières années. On connaît des souches antagonistes de plusieurs parasites différents, ainsi des *Trichoderma harzianum* et *Pseudomonas fluorescens* antagonistes de *Fusarium oxysporum* et *verticillium dahliae* sont étudiés en Europe et aux États-Unis (Besnard et Davet,

1993). Ces agents de lutte biologique présentent un intérêt supplémentaire, et certains travaux ont montré que certaines souches pouvaient, en absence d'organismes pathogènes, avoir un effet stimulant de croissance sur diverses cultures (Whipps, 1997).

Parmi d'autres antagonistes qui ont un grand pouvoir inhibiteur face aux microorganismes pathogènes on trouve les bactéries lactiques dont les entérocoques qui sont isolés à partir de plusieurs produits alimentaires artisanaux, de plantes, de sol et de l'eau. Ces derniers sont moins connus dans le domaine de lutte biologique parce qu'ils sont en cours des études. L'*Enterococcus faecium* est une espèce appartenant à ce genre, qui est capable de survivre à haute température et dans des conditions environnementales défavorables (salinité, dessèchement,...) (Kholer, 2007 ; Cools et al., 2001). Elle peut produire des bactériocines (entérocoques) et des métabolites qui agissent comme des substances antimicrobiennes (Caplice et al., 1999 ; McAuliffe et al. 2001).

Dans ce sens, l'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans le domaine de lutte biologique par la mise en évidence de pouvoir antagonistes des souches d'*Enterococcus faecium* isolées à partir de rhizosphère des oliviers vis-à-vis des champignons pathogènes.

La stratégie d'étude de ce travail consiste à :

- Isoler à partir de rhizosphère des oliviers une population bactérienne spécifique en l'occurrence des *Enterococcus faecium* ;
- Sélectionner et identifier les souches caractéristiques après une série des tests biochimiques et physiologiques ;
- Déterminer *in vitro* l'activité antifongique de certains souches sélectionnés d'*Enterococcus faecium* vis-à-vis des certains champignons pathogènes appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ;
- Interpréter et discuter les résultats obtenus ; enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse bibliographique

I. Les Entérocoques

I.1. Introduction

Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, ainsi que dans une variété de produits alimentaires, et dans le sol et l'eau. Ils sont utilisés dans les aliments soit comme agents antimicrobiens, soit pour leurs propriétés organoleptiques et parfois comme probiotiques (Chen et al., 2003). Ce genre bactérien produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires. De plus, les bactériocines présentent l'avantage d'être rapidement digérées par des protéases du tractus digestif humain (Chen et al., 2003) sans produire de substances secondaires toxiques. Les bactériocines peuvent également trouver des applications dans le secteur médical (Turcotte et al., 2004) ou elles peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens dans l'industrie pharmaceutique (Folli et al., 2003).

I.2. Taxonomie

L'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme a été décrite en 1899 par Thiercelin (Thiercelin, 1899) et appelée initialement *Streptococcus faecalis* par Andrewes et Horder en 1906. Dans les années 1930, et sur base du système *Lancefield Serological Typing*, les *Enterococcus* étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D), comme d'autres bactéries lactiques du genre *Lactococcus* et *Vagococcus*, (Schleifer et al., 1984). Le terme *Enterococcus* était utilisé pour désigner les souches appartenant à cette espèce, par opposition aux souches de *Streptococcus bovis* et de *Streptococcus equinus*, rassemblées sous les termes de "Streptocoques du groupe D non-Enterocoques". Le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* en 1984 d'après les résultats des techniques de chimiotaxonomie et de génétique moléculaire : hybridation ADN-ADN ou ADN-rARN, et de séquençage des oligonucléotides de la sous unité 16S de l'ARN des ribosomes (Farrow et al., 1983 ; Garvie et al., 1981 ; Ludwig et al., 1985). Ce genre comprend actuellement plus de 14 espèces, parmi lesquelles *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* représentent plus de 90 % des souches isolées en pathologie humaine (Collins et al., 1989).

Le genre *Enterococcus* est placé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales, famille des Enterococcaceae, branche des *Clostridium*. Monstein et al. (1998) ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupes d'espèces. Actuellement, 35 espèces différentes ont été recensées sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S (cf. tableau 1).

Tableau 1 : les groupes de genre *Enterococcus* selon l'analyse de l'ARNr 16S (Aguilar-Galvez et al., 2012).

Groupes	Espèces
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. hermanniensis</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. pseudoavium</i> et <i>E. raffinosus</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> et <i>E. columbae</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. asini</i> , <i>E. canintestini</i> et <i>E. dispar</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. caccae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i> , <i>E. silesiacus</i> et <i>E. termitis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. canis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. ratti</i> , <i>E. thailandicus</i> et <i>E. villorum</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> et <i>E. gallinarum</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. aquimarinus</i> , <i>E. camelliae</i> , <i>E. italicus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> et <i>E. sulfureus</i>

Quelques espèces appartenant au genre *Enterococcus* ont été reclassées. Ainsi, *E. porcicus* a été reclassé comme *E. villorum* (De Graef et al., 2003), *E. flavescens* comme *E. casseliflavus* et *E. saccharominimus* comme *E. italicus* (Naser et al., 2006). Par ailleurs, quelques bactéries ont changé de genre, *E. seriolicida* a été classé comme *Lactococcus garvieae* (Eldar et al., 1996), alors que *E. solitarius* est devenu *Tetragenococcus solitarius* (Ennahar et al., 2005).

I.3. Caractéristiques

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif, disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules (Facklam et al., 1989 ; Horaud et al., 1990), (cf. figure 1). Généralement, ils forment des colonies caractéristiques roses ou rouges résultant de la réduction d'une substance (chlorure de triphényltétrazolium) (CEAEQ, 2000; APHA-AWWA-WEF, 1988; Leclerc *et al.*, 1996). Ils sont caractérisés par une oxydase positive, et généralement un catalase négatif. Certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase (Schleifer et al., 1984). Comme les streptocoques et les lactocoques, les entérocoques sont anaérobies aéro-

tolérants. Ils sont également homofermentaires. Ils produisent essentiellement de l'acide lactique et en quantité moindre, de l'acétate, du formiate et de l'éthanol. Les produits finaux du métabolisme peuvent changer en fonction de la présence ou non d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. Ainsi en anaérobiose, le lactate est le principal produit du métabolisme du glucose, tandis qu'en condition d'aérobiose, les produits du métabolisme sont l'acétate et le CO₂. Ils sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le N-acétyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le β-gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le D-mannose, le β-D-méthyle glucopyranoside, le ribose, la salicine et le tréhalose (Schleifer et al., 1984 ; LeBlanc, 2006).

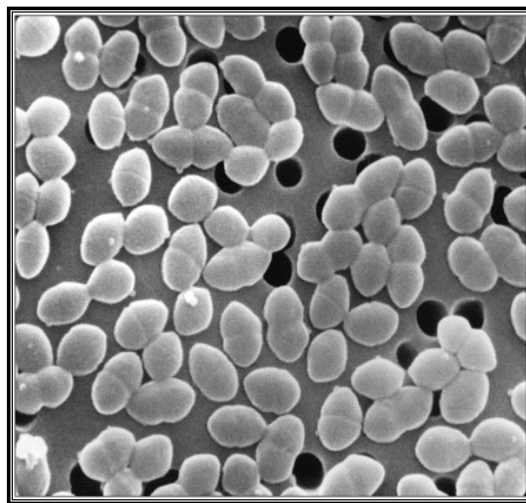


Figure 1 : *Enterococcus* sp. observée en microscopie électronique

Source : (<http://www.cmaj.ca/content/182/11/E505/F1.large.jpg>)

Mais la particularité des entérocoques de se multiplier dans les milieux usuels à base de peptones (trypticase-soja et milieu de Mueller-Hinton) en l'absence de facteurs de supplémentation constitue un facteur important dans la reconnaissance de ces bactéries. La croissance des entérocoques en milieu "hypersalé", contenant 6.5 g/l de NaCl (propriété halophile) permet avant tout de les distinguer des streptocoques, de même que leur capacité à tolérer la présence de 40 % (vol/vol) de bile. En pratique, la gélose bile-esculine permet d'observer la présence d'un halo noir autour des colonies qui sont capables à la fois de se multiplier en présence de bile et d'hydrolyser l'esculine. Ces deux caractères sont partagés par les streptocoques du groupe D comme *S. bovis* et *S. equinus*. Contrairement aux streptocoques, les entérocoques peuvent se multiplier à un pH entre 4.4 et 9.6 et à des températures de 10 à 45°C (micro-organismes mésophiles), avec une température optimale de

35 °C, et peuvent survivre après 30 mn de chauffage à 60°C. Cependant ces propriétés sont difficiles à utiliser en pratique pour des tests standardisés. Il en est de même du caractère hémolytique ou non des entérocoques sur gélose au sang: la plupart des souches d'entérocoques sont α - ou non-hémolytiques, et le caractère β -hémolytique de certaines souches ou de certaines espèces dépend des conditions de culture (Facklam, 1972 ;Schleifer et al., 1984 ; LeBlanc, 2006). Pour distinguer rapidement les entérocoques des streptocoques, et en particulier des streptocoques du groupe D, un des caractères les plus discriminatifs est la production de pyrrolidonyl-arylamidase. Cette propriété, qui peut être reconnue en quatre heures, est constante chez tous les entérocoques (Bosley et al., 1983 ; Fertally et al., 1987 ; Freney et al., 1992). Cependant, cette enzyme ne leur est pas spécifique. Elle est en effet présente chez les souches des genres *Aerococcus* et *Gemella* (Facklam et al.,1989), ainsi que chez quelques espèces de streptocoques (Kaufhold et al., 1989). Les entérocoques sont caractérisés aussi par la présence de l'antigène du groupe D. En effet, cette propriété antigénique, caractéristique de certains acides teichoïques de paroi (Wicken et al., 1963), est détectée chez 80 % de l'ensemble des souches d'origine humaine (Facklam et al.,1989), mais ce pourcentage varie de 30 à 100 % des souches selon les espèces (Collins et al., 1989 ; Bosley et al., 1983). Ainsi, les entérocoques sont peu sensibles aux pénicillines. Selon les espèces, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la pénicilline G et de l'amoxicilline sont 10 à 1000 fois supérieures à celles des streptocoques. De plus ils sont résistants aux céphalosporines et souvent sélectionnés *in vivo* par ces antibiotiques (Kaye, 1982). Les entérocoques sont habituellement sensibles à la vancomycine, à l'exception de *Enterococcus gallinarum* et de *E. casseliflavus* (Kaplan, 1988 ; LeClercq et al., 1992).

I.4. Habitat

Les entérocoques sont de nature ubiquiste, leur capacité d'adaptation à des environnements inhospitaliers permet de les retrouver dans différentes eaux (usées, douces et de mer), dans le sol, sur les végétaux et dans le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud (y compris celui de l'homme) (Manero et al., 1999). Leur adaptabilité à différents écosystèmes a permis de retrouver trois clones d'*E. faecalis* et d'*E. casseliflavus* dans du lait, dans du fromage ou dans des matières fécales humaines (Gelsomino et al., 2002).

La plupart des espèces du genre *Enterococcus* font partie intégrante de la flore intestinale de nombreux animaux, leur concentration dans les matières fécales peut varier de 10^5 à 10^7 UFC g⁻¹ (Kayser, 2003). Les entérocoques les plus fréquemment isolés dans les

fèces de l'homme sont *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* (Murray, 1990 ; Leclerc et al., 1996). Dans la plupart des contenus intestinaux d'animaux (les volailles, les bovins, les chiens, les chevaux, les moutons), *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae* sont représentés ; par contre, chez les chèvres et les lapins, on ne retrouve que *E. faecalis* et *E. hirae* (Devriese et al., 1987). Dans des échantillons provenant de sources environnementales (composts, eaux usées, sédiments et eaux de piscine), il a été démontré que les espèces prédominantes sont *E. faecalis* (40 %) et *E. faecium* (30 %), suivies de *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinaru* et *E. raffinosus*, avec une prévalence différente de l'espèce selon la source (Pinto et al., 1999).

D'autre part, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* sont des bactéries qui ont été isolées d'échantillons végétaux d'ensilage d'herbe (Leclerc et al., 1996). De plus, *E. mundtii* a été trouvé dans de la chicorée fraîche (Bennik et al., 1998) et des graines de soja (De Kwaadsteniet et al., 2005 ; Todorov et al., 2005 ; Zendo et al., 2005).

I.5. Résistance à des antibiotiques

Cette propriété est due à la présence intrinsèque de gènes de résistance principalement acquis par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons). La plasticité du génome des entérocoques leur permet de s'adapter constamment à leur environnement et de résister à une large variété d'antibiotiques (Inoue et al., 2006 ; Sánchez et al., 2007).

Les espèces des *Enterococcus* ont un niveau élevé de résistance aux antibiotiques, et *E. faecium* est l'espèce avec le niveau le plus haut de résistance en comparaison avec les autres espèces (Kummerer, 2004). L'utilisation élevée des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, bétail, aquaculture, et agriculture, associée avec des divers mécanismes de transfert génétique bactériale, peut causer une résistance antibiotique de bactérie et /ou ces gènes de résistance en différentes habitations (Freitas et al., 2011 ; Klare et al., 2003 ; Kummerer, 2004). Les *Enterococcus* ont une résistance intrinsèque aux semi-synthétiques penicillines, aminoglycosides (niveau faible), vancomycine (niveau faible pour certaines espèces telle que *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*), lincosamides (la plus part), polymyxines, streptogramine A (*E. faecalis*) and monobactames (Facklam et al., 2002 ; Mutnick et al., 2003), Elles ont de plus une résistance naturelle aux nitrofuranes et aux sulfamides.

En addition, elles sont capables d'acquérir une multi-résistance au plusieurs antibiotiques (Aarestrup et al., 2000 ; Poeta et al., 2007). le problème de résistance au antibiotiques d'*Enterococcus* est non seulement limité au manipulations cliniques mais aussi au autres environnements, comme le tractus intestinal humain et les eaux usés (Araújo et al., 2010 ; Poeta et al., 2006 ; Romalde et al., 1996).

I.6. Les métabolites secondaires et les bactériocines (entérocoques) produites par les entérocoques

I.6.1. Les métabolites secondaires

Les entérocoques comme les autres bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes. Les principaux métabolites impliqués dans l'activité antagonistes sont des acides organiques. L'acide lactique est le principale produit de la fermentation par les bactéries lactiques, c'est un produit majoritaire issu de la fermentation mais d'autres acides organiques principalement acétique, formique, propionique, ou encore caproïque et benzoïque sont également produits (Noda et al., 1980 ; Kuwaki et al., 2002).

I.6.2. Les bactériocines

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées "Entérocoques". Ces bactériocines sont des peptides de faibles poids moléculaires constitués de 20 à 60 acides aminés. Les entérocoques qui produisent des bactériocines semblent avoir un avantage écologique en comparaison aux autres bactéries non les productrices qui habitent le même écosystème (Poeta et al., 2006). La production des bactériocines est également responsable de la survivance et la colonisation des bactéries (Homan et al., 2002). Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (Van Belkum et al., 2000 ; Chen et al., 2003 ; Dortu et al., 2009). Généralement, les bactériocines sont constituées de deux domaines structuraux : un domaine hydrophile et cationique en position N-terminale (appelé *leader* double-glycine) dont la longueur minimale est de 14 résidus et qui peut atteindre 30 résidus (Nes et al., 1996) ; la seconde région, en position C-terminale, est hydrophobe et/ou amphiphile (Johnsen et al., 2005).

La cible principale des entérocoques est la membrane cytoplasmique. Les pores sont formés dans la membrane cellulaire qui épuise le potentiel de trans-membrane et le gradient de pH. Pour cette raison, les molécules intracellulaires indispensables sont coulées des cellules (Cleveland et al., 2001). L'efficacité des entérocoques contre les bactéries pathogènes et les bactéries causant un gaspillage alimentaire (*Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp., etc.) est bien démontrée dans une variété de systèmes alimentaires (Aymerich et al., 2000). L'entérocoque AS-48 produite par *E. faecalis* S-48 a été le premier entérocoque purifié jusqu'à homogénéité et se définissait comme un antibiotique de peptide cyclique (Martinez-Bueno et al., 1994). Depuis lors, plusieurs entérocoques nouvelles ont été caractérisés. Toutefois, bon nombre des entérocoques identifiées n'ont pas purifiés jusqu'à homogénéité.

- **Classification des entérocoques**

Franz et al. (2007) ont proposé une classification des entérocoques, sur base de leurs séquences et des modifications post-traductionnelles. Le schéma actuel inclut quatre classes (cf. tableau 2). La diversité des entérocoques est due au nombre important d'espèces d'entérocoques, à leur origine, à leur nature ubiquiste, ainsi qu'à leur potentialité d'acquérir du matériel génétique.

Tableau 2 : classification des entérocinés (Franz et al., 2007)

Classe	Sous-classe	Sous-groupe / Caractéristiques	Exemples
Classe I	Entérocinés lantibiotiques	Bactériocine hémolytique, formé de deux peptides <i>cyLL_L</i> et <i>cyLL_S</i> , son action a besoin de la présence des deux peptides	Cytolysine
Classe II. Petits peptides non lantibiotiques	II.1 Possède une région cationique hydrophile avec une séquence conservée, YGNGVxC en N-terminale. Deux cystéines formant un pont disulfure dans la partie N-terminale	<u>Sous-groupe 1</u> Possède un transporteur type ABC pour la sécrétion des entérocinés <u>Sous-groupe 2</u> La sécrétion est réalisée via une préprotéine maturée. Sont coproduites avec une protéine de l'immunité	Entérocin A, entérocin CRL35, mundticine et mundticine KS Entérocin P, entérocin SEK4, bactériocine 31, bactériocine T8 et bactériocine RC714
	II 2 Synthétisées sans peptide leader, ne possède pas la séquence conservée, ni le système de sécrétion ABC transporteur	<u>Sous-groupe 1</u> Protéines monomériques <u>Sous-groupe 2</u> Besoin de la formation d'un complexe hétérodimérique	Entérocin RJ-11, entérocin Q et entérocin EJ97 Entérocin L50 (dimère A et B) et entérocin MR10 (dimère A et B)
	II 3	Entérocinés linéaires avec un peptide <i>leader</i>	Entérocin B, bactériocine 32 et entérocin 1071 A et B
Classe III, entérocinés cycliques		Peptides cycliques	Entérocin AS-48 et entérocin AS-4S RJ
Classe IV, protéines de haut poids moléculaire		Peptide de haut poids moléculaire (34.5kDa) et thermolabile	Entérolysine A

I.7. Enterococcus faecium

Enterococcus faecium est moins fréquemment isolé que *E. faecalis* chez l'homme (cf. figure 2), en Europe et aux Etats-Unis, alors que cette espèce serait plus souvent isolée au

Japon et en Inde (Hill et al., 1971). *E. faecium* diffère de *E. faecalis* par l'incapacité à utiliser le pyruvate comme source de carbone et - exception faite de quelques rares souches - par l'absence de croissance sur gélose au tellurite de potassium, ainsi que par l'absence de fermentation du sorbitol et par la fermentation de l'arabinose (Facklam et al., 1989). Des variantes de *E. faecium*, caractérisés par la fermentation du raffinose sont mentionnés chez les animaux, ainsi que dans le catalogue "rapid ID 32 Strep" (BioMérieux) (Devriese et al., 1987). Un haut niveau de résistance à la pénicilline est très évocateur de l'espèce *E. faecium*. En effet, les CMI de la pénicilline sont souvent plus élevées : elles dépassent 32 mg/L pour plus de 50% des souches et peuvent atteindre 128 mg/L (Acar et al., 1988 ; Gray et al., 1991). Il existe cependant des souches plus sensibles pour lesquelles les CMI de la pénicilline sont de 0.25 mg/1. Des résistances de haut niveau à la streptomycine et/ou à la kanamycine caractérisent respectivement environ 50% et 70% des souches (Horaud et al., 1991, Murray, 1990). Près d'un tiers des souches est sensible à la lincomycine, ce qui est également un caractère d'orientation pour l'identification (LeClercq et al., 1991). Les souches résistantes à la vancomycine sont encore rares (LeClercq et al., 1992).

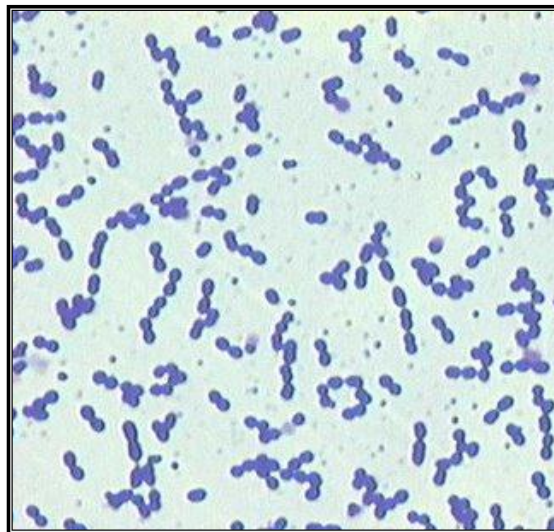


Figure 2 : *Enterococcus faecium* en observation microscopique

Source : (<http://photos1.blogger.com/blogger/1562/3203/1600/EFAEC.2.jpg>)

II. Les champignons phytopathogènes

Les moisissures sont omniprésentes dans la nature. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus* (cf. figure 3). Elles sont aérobies strictes (Bouix et Leveau, 1993), capables de se développer sur toutes sortes de nourriture : céréales, viande, lait, fruits, légumes, ...etc (Filtenborg et al., 1996). Hétérotrophes, peu exigeantes et possèdent un potentiel élevé de sécrétion d'enzymes exocellulaires (Bouix et Leveau, 1993). Certaines moisissures vivent en symbiose avec d'autres organismes : les plantes vertes (champignons mycorhiziens), les algues (lichens) et les bactéries. Beaucoup mènent une vie parasite vis-à-vis des animaux et des plantes, et s'attaquent aux végétaux en pleine croissance, aussi bien aux jeunes plantules qu'aux feuilles et aux fruits, et provoquent de sérieuses maladies (rouilles, mildious, etc.) (Bouix et Leveau, 1993).

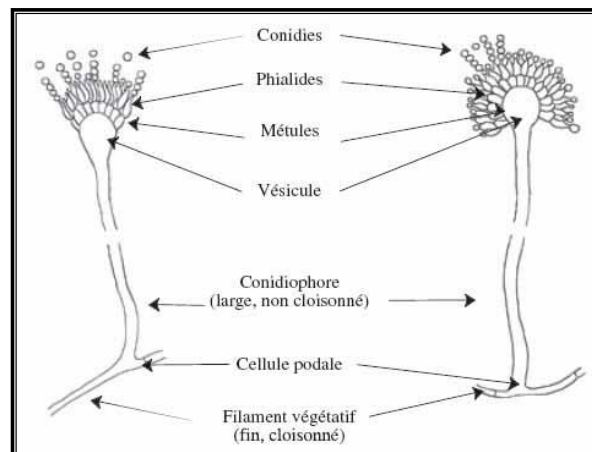


Figure 3 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Morin, 1994).

II.1. Moisissures des céréales

Plus de 150 espèces de moisissures et de levures ont été rendus compte dans les grains de céréale. La plupart des moisissures sont trouvés probablement sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs (Christensen, 1982). Les fourrages et les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment l'activité d'eau libre (a_w), la température, la présence d'oxygène, la nature de la substance et le pH (Jouany et Yiannikouris, 2002). Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité (20 à 25%) pour leur croissance (Hesseltine, 1976), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18% d'humidité (Molinié et Pfohl-Leskowicz, 2003). Les mycètes

colonisant les grains ont été classifiés dans des groupes, connus sous le nom de moisissure de champ et de stockage (Magan et Lacey, 1988) distinctes de points de vue écologique.

II.1.1. Les champignons de champs

Dans le champ, les céréales sont principalement attaquées par les moisissures qui ont besoin pour leur croissance d'un facteur d'humidité élevé (de 0.88 au moins) tandis que pendant le stockage, les moisissures qui se développent supportent des degrés d'humidité moindres (FAO, 2003). Les céréales sont contaminées dès avant la récolte par une mycoflore dite du « champ » qui comprend un grand nombre d'espèces appartenant aux genre, *Alternaria*, *Cheatomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium* ...etc (Belyagoubie, 2006). *Fusarium* sp. peuvent infecter les céréales à paille et le maïs. Ces champignons produisent des mycotoxines notamment au niveau de l'épi au champ (Fabrice et Calair, 2006).

II.1.2. Les champignons de stockage

Les principaux groupes de champignons susceptibles de se développer pendant l'entreposage sont les *Aspergillus* et les *Penicillium* (Aliou et Jan, 1991 ; FAO, 1995). Aux fortes teneurs en humidité, les *Fusarium* (champignon des plantes en plein champ) peuvent apparaitre sur des céréales alimentaires en magasin (Aliou et Jan, 1991). Lors de la période de stockage, les *Fusarium*, très répandus dans le sol, ont des besoins en eau assez importants et ils fréquentent sur les cultures au champ. Ce n'est pas le cas d'*Aspergillus* et *Penicillium* qui croissent plutôt sur les denrées stockées (Zaid et Pierre, 2011). Les moisissures peuvent se développer rapidement sur les céréales et les maïs conservés dans des conditions humides. La microflore du blé, à la récolte, est composée d'un très grands nombre de genres de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) (Armand et Germain, 1992).

II.2. Moisissures des légumes secs

II.2.1. La flore du champ

Les grains à la récolte sont porteurs de moisissures champêtres, surtout adaptées aux conditions extérieures. Il s'agit essentiellement de *Fusarium*, qui peut dans certaines

conditions produire au champ des mycotoxines toxiques. Ces dernières sont thermorésistantes, donc le séchage ne les détruit pas. Les précautions à prendre pour les éviter sont d'ordre agronomique en privilégiant les variétés résistantes, l'utilisation du labour avant le semis, un programme antifongique adapté et une rotation des cultures (Terrain et Grallet, 2003).

II.2.2. La flore intermédiaire

Elle regroupe les germes capables d'un développement limité en début de stockage, en conditions particulières et notamment sur grains suffisamment secs. *Cladosporium*, *Trichoderma*, et surtout les Mucorales comme *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, avec les levures *Candida*, *Torulopsis*, etc, sont les représentants habituels de cette flore intermédiaire, dont la mise en évidence révèle, très souvent, un stockage en conditions confinées et trop humides (Blanc, 1982).

II.2.3. La flore de stockage

La flore de stockage est composée d'espèces xérophiles adaptées à des substrats relativement secs, qui peuvent proliférer au cours du stockage (Feillet, 2000). *Penicillium* et *Aspergillus* ne se trouvent qu'en faible proportion sur les grains à la récolte, mais, adaptés aux substrats relativement secs, ils peuvent prendre leur essor au cours du stockage, alors que les autres espèces, plus hydrophiles, se multiplient moins activement ou régressent. Les origines du peuplement microbien sont multiples. Une grande partie des éléments qui le composent proviennent de la plante sur pied : c'est ainsi que des plantes fusariées peuvent donner des grains riches en *Fusarium* (Multon, 1982).

II.3. Aliments composés pour les animaux

Les aliments composés peuvent être contaminés par les spores qui étaient initialement présentes dans les céréales ou dans les autres ingrédients (oléagineux) qui entrent dans leur composition. Ils peuvent aussi être contaminés au cours du processus de fabrication ou pendant le stockage. Les espèces de moisissures les plus fréquemment retrouvées dans les aliments composés appartiennent aux mêmes genres que ceux contaminant les céréales : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

Les études disponibles concernant l'évaluation du niveau de contamination fongique des aliments pour animaux concernent en général les aliments composés pour animaux monogastriques (volailles, porcs...) qui sont plus sensibles à l'action des mycotoxines que les ruminants. Malgré les processus technologiques permettant souvent la réduction de la contamination fongique à cause de l'élévation de température (pendant la granulation par exemple), les résultats disponibles montrent souvent une contamination fréquente par de nombreuses espèces fongiques (AFSSA, 2006).

II.4. Autres végétaux

Les moisissures sont fréquemment retrouvées dans les céréales, mais elles peuvent aussi se développer sur d'autres végétaux destinés à l'alimentation humaine ou animale (légumes, fruits). En 2003-2004 en Lituanie, (Lugauskas et al., 2005) ont analysé la contamination mycologique de légumes nouvellement récoltés puis après stockage. Le but de l'étude était de détecter des espèces fongiques capables de synthétiser les métabolites toxiques. Des échantillons de carottes, d'oignons et de choux ont été prélevés dans des entrepôts. *Penicillium expansum*, *P. nalgiovense* et *P. verrucosum* ont été retrouvés sur les carottes, *P. expansum* sur les oignons et *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium funiculosum* et *P. expansum* sur les choux. La fréquence de contamination des légumes était importante (Lugauskas et al., 2005).

III. La lutte biologique

III.1. Les inconvénients de la lutte chimique

Les pesticides chimiques, dans une large mesure, représentent une classe de composés qui, malgré leur aide incontestable apportée dans la protection des végétaux, produisent très souvent, voir systématiquement, une grande variété de résidus toxiques dans l'environnement. Ceux-ci ont une répercussion directe sur la santé des végétaux, des animaux, et des êtres humains. Ces effets néfastes incluent des changements importants dans la variété des plantes autochtones, le déclin de la population de papillons, l'augmentation du nombre de malformations chez les amphibiens (Barinaga, 1990 ; Blaustein et al., 1990 ; Longley et al., 1997 ; Lowcock et al., 1997 ; Nemes-Kosa et al., 1995 ; Russel et al., 1997 ; Spawn et al., 1997), l'implication dans le cancer du sein chez la femme et la contamination du lait maternel (Backwood et al., 1998), ainsi que les effets associés à l'augmentation du nombre d'autres cancers et aux maladies génétiques, à la baisse de fertilité masculine et au vieillissement (Carbonell et al., 1995 ; Bain et al., 1996 ; Ribas et al., 1997). De plus, Kolpin et al (1998) ont montré que les produits de dégradation de certains herbicides sont non seulement persistants et stables dans l'environnement avant leur minéralisation complète, mais encore, parfois aussi toxiques que le composé d'origine.

Par exemple, Le bromure de méthyle utilisé comme gaz de fumigation des sols de fraisières et framboisières contre le *phytophthora fragariae* et autres champignons, pose le problème de l'exposition des agriculteurs. Ce pesticide est toxique envers le système nerveux central et cause des dommages aux poumons, aux yeux, et à la peau. L'exposition directe provoque des maux de tête, un affaiblissement général, une vision floue des vertiges, des symptômes de psychoses et léthargie, ainsi que des pneumonies, paralysies, problèmes cardiaques et possiblement le cancer (WHO, 1995).

Outres les effets polluants et toxiques, l'utilisation de certains fongicides a mené à la sélection de champignons phytopathogènes résistants. Cette sélection est favorisée par l'utilisation de fongicides spécifiques, des périodes de contact prolongés avec l'agent pathogène et l'administration de doses chimiques sub-létales (Erwin, 1973 ; Evans, 1971). La plupart des fongicides exercent leur effet en interagissant avec une cible protéique spécifique et c'est paradoxalement par l'étude génétique de champignons phytopathogènes résistants que de nombreux mécanismes de toxicité ont été élucidés (Steffens et al., 1996).

Face aux nombreux inconvénients survenus après l'utilisation des pesticides, d'autres alternatives ont été recherchés afin de protéger les végétaux contre leurs agents pathogènes.

Elles tentent de relever un double défi, soit celui de limiter efficacement les pertes agricoles dues aux maladies végétales et de préserver l'environnement et la santé des êtres vivants. L'une des alternatives faisant l'objet d'une recherche intensive est la lutte biologique.

III.2. La lutte biologique

III.2.1. Généralités

Au début du XX^{ème} siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. En 1919, Smith a défini la lutte biologique comme l'utilisation des ennemis naturels pour le contrôle des maladies phytopathogènes (Driesche et Bellous, 1996). L'étude de Sanford En 1926, sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *S. scabies* matérialise ce concept en observant que des microorganismes saprophytes pouvaient entraîner une diminution de l'intensité de ce pathogène du sol. Quelques années plus tard, Weindling en 1932 a démontré que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol. En 1964, De Bach a donné une nouvelle définition à la lutte biologique : « c'est l'action des parasites, prédateurs ou pathogènes dans le maintien de la densité de la population des microorganismes à un niveau inférieur de celle observée en leur absence » (Toussaint, 1996).

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. Dans ce travail, c'est cette définition que nous utiliserons. Une autre définition plus large de la lutte biologique est parfois utilisée : "Toute action mettant en jeu des organismes modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite" (Corbaz, 1990).

Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agro-écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) (Altieri, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000).

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme mais à long terme, leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger. Par contre, la lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990; Toussaint, 1996).

III.2.2. L'intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Emmert et Handelsman (1999) affirment que la lutte biologique peut être aussi efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes que l'utilisation des fongicides chimiques. Singh *et al.* (2003) ont montré que *Pseudomonas fluorescens* peut réduire de 78% la maladie de la pourriture du collet de la plante de piment rouge causé par *Sclerotium rolfsii*. Également, Mao *et al.* (1998) ont pu réduire dans le champ les maladies de la tomate due aux *S. rolfsii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* par l'utilisation de deux agents biologiques *Gliocladium vireus* et *Burkholderia cepacia*.

La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme. L'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à ce que la lutte biologique devient plus durable que les produits chimiques (Cook, 1993; Benbrook *et al.*, 1996). Actuellement, plusieurs produits de lutte biologique sont commercialisés et utilisés dans le monde (Fravel, 2005; Errakhi, 2008) (cf. tableau 3).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003). Ce paramètre correspond à la compétence rhizosphérique (Whipps, 2001). Cette dernière réside dans l'adaptation de l'agent antagoniste aux conditions biotiques et abiotiques du sol. L'agent aussi doit être doté d'une capacité à coloniser les racines de la plante hôte (Nautiyal, 2000; Whipps, 2001). En plus de cette compétence, l'agent de biocontrôle doit disposer de divers mécanismes de lutte biologique lui permettant d'inhiber le développement de l'agent phytopathogène et de réduire ainsi l'incidence de la maladie qu'il provoque (Errakhi, 2008).

Tableau 3: quelque agents antagonistes commercialisés sous forme de produits biologiques utilisés dans le traitement de certaines maladies phytopathogènes (Sabaratham et Traquair, 2002; Jijakli, 2003; Punja et Utkhede, 2003).

Produit	Microorganismes	Maladies traitées	Distributeur
AQ 10	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Mildious	Ecogen, USA
Binab T	<i>Trichoderma</i> spp.	Pourriture des racines, fusariose	Bio innovation AB, Nouvelle Zélande, USA
Biofox C Fusaclean	<i>Fusarium oxysporum</i> (non pathogène)	Fusariose	S.I.A.P.A., USA
Bio-fungus	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pourriture des racines, fusariose	De Ceuster, USA, UE, Nouvelle Zélande
Intercept	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pourriture des racines	Soil Technologies, USA
PSSOL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Pourriture des racines	Natural Plant Protection, France
Contans KONI	<i>Coniothyrium minitans</i>	Pourriture des racines	Prophyta Biologischer, Hongrie, Allemagne
Polyversum	<i>Pythium oligandrum</i>	Pourriture des racines	Biopreparaty, Tchéquie
Primastop (Prestop mix)	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Pourriture des racines, fusariose	Kemira Agro, Finlande
Root Shield, plant shield, T-22 Planter	<i>Trichoderma harzianum</i> T22	Pourriture des racines	Bioworks, USA, UE, Nouvelle Zélande
Soil Gard	<i>Gliocladium virens</i> GL-21	Pourriture des racines	Therma Trirlogy, USA
Sporodex	<i>Pseudozyma flocculoza</i>	Mildious	Plant Products, Canada
Trieco	<i>Trichoderma viride</i>	Pourriture des racines, fusariose	Ecosens Laboratories, Inde
GBO3, MBI 600	<i>Bacillus subtilis</i>	Fonte des semis	Horticulture, USA
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Fusariose, fonte des semis	Kemira Agro Oy, Finlande

III.3. Les agents de lutte biologique les plus utilisés contre les microorganismes phytopathogènes

III.3.1. Les champignons

Parmi les champignons les plus utilisés, nous pouvons citer *Trichoderma* spp. Ce dernier a été utilisé comme agents de lutte biologique contre un large spectre de pathogènes aussi bien telluriques que foliaire. Ils agissent par différents mécanismes comme la production des enzymes lytiques (chitinases, β -1-3-glucanase et β -1-4-glucanase), la production d'antibiotiques, la compétition spatiale et nutritionnelle (Elad et al., 1999), l'induction des

systèmes de résistance des plantes (Brimner et Boland, 2003) et l'inactivation des enzymes de l'agent pathogènes (Elad et al., 1999). Une souche de *Trichoderma* spp. s'est avéré active contre de nombreux phytopathogènes à savoir: *Pythium ultimum* (Mukherjee et al., 2008), *Botrytis cinerea* (Mukherjee et al., 2008) et *Rhizoctonia solani* (Mazzola, 2002).(cf. tableau 5)

III.3.2. Les bactéries

Certaines bactéries à Gram-positif sont employées comme agent de lutte biologique. Elles contrôlent plusieurs maladies phytopathogènes. Parmi ces bactéries, les souches de *Bacillus subtilis* et les actinomycètes sont les plus étudiés. La plupart des espèces actinomycètes vivent dans le sol, qui est leur réservoir principal. Ils peuvent agir par différents mécanismes d'action (Emmert et Handelsman, 1999). L'action antagoniste de ce groupe bactérien dans la lutte biologique a été démontrée contre *Fusarium oxysporum* f sp. *albedenis* (Sabaou et al., 1998), *Alternaria* sp. (Khamna et al., 2009) *Phytophthora* sp. (Xiao et al., 2002), *Pythium ultimum* (Mahadevan et Crawford, 1997), *Colletotrichum lindemuthianum* (Tu, 1988), *Verticillium dahliae* (Berg et al., 2000) et *Rhizoctonia solani* (Trejo-estrada et al., 1998). *Pseudomonas fluorescens*, bactérie à Gram-négatif, est aussi un agent de biocontrôle efficace contre différents phytopathogènes (Thomashow et al., 1997; Raaijmakers et al., 2002).

III.3.3. Les extraits de plantes

Plusieurs chercheurs ont mis le point sur les propriétés que possèdent certaines des huiles essentielles des plantes aromatiques, notamment contre différentes espèces fongiques (Adebayo et al., 2010 ; Nagendra Prasad et al., 2010). Pour le conditionnement des fruits, différentes technologies ont été utilisées dans le but de ralentir l'accélération du processus de maturation et minimiser les détériorations microbiennes en post-récolte.

Actuellement, les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour allonger la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés anti-microbiens et anti-oxydants peuvent être considérées comme alternative afin de résoudre les problèmes d'altération post-récolte liées aux contaminants et d'éviter la perte des qualités organoleptiques des fruits pendant l'entreposage (Serrano et al., 2008). Actuellement, dans le domaine du conditionnement des fruits destinés à couvrir le marché

local européen ou bien destinée à l'exportation, plusieurs travaux de recherche portent sur l'utilisation de ces composés volatils comme un moyen de base dans les emballages actifs capables de les laisser diffuser lentement avec le temps (Serrano et al., 2008). Les huiles essentielles les plus antiseptiques sont celles de: la cannelle, le thym, le girofle, la lavande, et l'eucalyptus (Bruneton, 1999).

III.4. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique

III.4.1. Définition de l'antagonisme

Ce terme est souvent pris dans un sens très large, notamment dans les ouvrages traitant de lutte biologique. Nous utilisons ici dans un sens beaucoup plus restreint, pour désigner la situation où un organisme exerce un effet inhibiteur sur un autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer. L'antagonisme présente donc une étape bien définie entre l'amensalisme (situation - 0) et la compétition (situation où, comme nous le verrons, les deux partenaires sont en difficulté) (Davet, 1996). Beaucoup d'antagonistes existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. L'homme a toujours essayé d'augmenter l'efficacité des antagonistes à travers l'introduction de nouvelles grandes populations de ces microorganismes au champ où elle n'existe pas, ou à travers la stimulation de leur croissance en apportant des amendements au sol. Dans les deux cas, le résultat est un accroissement des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes. Bien que certains cas de lutte biologique efficace aient été enregistrés, le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre, les résultats au champ ne sont pas d'habitude d'un succès particulier (Nasraoui et al., 2003).

III.4.2. Les mécanismes d'action

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante (cf. tableau 4). L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

III.4.2.1. Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakli, 2003). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (Corbaz, 1990). Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène. La fonte des semis du coton due à *Pythium ultimum* peut être combattue par un enrobage des semences avec la souche de *P. fluorescens* Pf 5. Cette souche produit un antibiotique, la polyulutérine. La fonte des semis est ainsi réduite de façon significative aussi bien par l'utilisation de ce *Pseudomonas* comme agent d'enrobage que par l'utilisation de l'antibiotique purifié (Howell et Stipanovic, 1980).

III.4.2.2. Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (Jijakli, 2003).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène au niveau des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certaines bactéries produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Les sidérophores de ces microorganismes captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance. Ce mécanisme est souvent attribué aux agents antagonistes de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (Corbaz, 1990). Des sidérophores produits par *P. fluorescens* formeraient un complexe avec les métaux du sol et les rendraient non disponibles pour les autres microorganismes de son environnement dont le *Pythium ultimum*, causant la fonte des semis (Howell et Stipanovic, 1980).

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (Benítez et al., 2004). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Benítez et al., 2004; Compant et al., 2005).

III.4.2.3. Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. Valueva et Mosolor (2004) ont montré que les enzymes utilisées par les antagonistes ont souvent une activité en mélange ou en synergie avec les antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus sp.* peuvent être perforées dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes vampyrellides. Cette dégradation entraîne une diminution de la population des agents pathogènes. Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (El-Tarabily et al., 1997; Sabaou et al., 1998; Errakhi, 2008).

III.4.2.4. Induction des systèmes de résistance de la plante hôte

Des microorganismes de lutte biologique sont capables de déclencher une résistance systémique induite (ISR) chez la plante hôte, ce qui peut rendre l'hôte plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes (Jijakli, 2003). L'induction des systèmes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par Kempe et Sequira (1983). Ces derniers ont remarqué que des pré-traitements par des bactéries ont protégé des tubercules de pomme de terre des infections de *Pseudomonas solanacearum*.

Le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs. Ces derniers sont des substances mettant en branle les mécanismes de

défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique (Agrios, 1988; Toussaint, 1996). Par exemple, *Trichoderma harzianum* T-203 induit des changements structuraux et chimiques des parois cellulaires des plantes ce qui augmente leur résistance aux infections par les phytopathogènes (Brimner et Boland, 2003).

Tableau 4: Agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes (Errakhi, 2008).

Agent de biocontrôle	Agents phytopathogènes cibles	Mécanisme (s) d'action
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Roselliniana</i> spp.	Parasitisme
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Sclerotium rolfii</i>	Parasitisme
<i>Trichoderma</i> spp.	Plusieurs champignons phytopathogènes	Parasitisme, Antibiose Compétition
<i>Streptomyces</i> sp. Di-944	<i>Rhizoctonia solani</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp. 93	<i>Pythium</i> , <i>aphanomyces</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i> spp.	Antibiose
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	<i>Streptomyces scabies</i>	Antibiose
PonSSII		Compétition
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> et <i>Erwinia amylovora</i>	Antibiose Compétition
<i>Pseudomonas</i> spp. DF-41 et PA-2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Antibiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium</i> <i>rolfsii</i> et <i>Puccinia arachidis</i>	Antibiose Compétition
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Antibiose

III.4.2.5. Diminution de l'agressivité du pathogène

Un agent de biocontrôle peut également agir en affectant les facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène. L'intensité de symptômes de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de

l'haricot est réduite en présence de la souche *Trichoderma* T39. La réduction du développement du parasite ne s'observant qu'au cours du second jour d'incubation. Ce retard s'expliquerait par une production réduite par le pathogène des enzymes dégradant la pectine (Jijakli, 2003).

III.5. Utilisation des entérocoques en lutte biologique

Le spectre d'inhibition des *Enterococcus* a été largement étudié et caractérisé notamment au niveau de la lutte contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. et *Clostridium* spp. (Ghraiiri et al., 2008), mais aussi contre des bactéries Gram négatives, des champignons et des levures. Il a été rapporté que certaines souches d'*E. mundtii* peuvent inhiber certains virus (virus de l'herpès, de la rougeole et de la poliomyélite) (Wachsman et al., 1999 ; Wachsman et al., 2003 ; Todorov et al., 2005). Ces chercheurs expliquent cet effet sur la propagation du virus HSV (*Herpes Simplex Virus*) par une inhibition de la synthèse des glycoprotéines (Wachsman et al., 2003). Selon Todorov et al. (2005), le mécanisme impliqué dans l'activité antivirale n'est pas bien connu mais il pourrait y avoir agrégation des particules virales ou blocage de leurs sites récepteurs.

Matériels et méthodes

1. L'échantillonnage

Dans le but d'isoler des souches d'*Enterococcus faecium* de la zone rhizosphérique des oliviers et d'étudier leur pouvoir antifongique vis-à-vis des champignons phytopathogènes, un total de 5 échantillons de sol ont été prélevés dans une exploitation située dans la région de Thelata (Commune de Taher, Wilaya de Jijel). Cette région a été choisie sur la base de leurs vocations agricoles, en particulier la culture des oliviers.

Des quantités de 10 à 20 g de sol rhizosphérique ont été prélevés aseptiquement à l'aide d'une cuillère stérile à des profondeurs de 10 à 15 cm, puis récupérés dans des flacons en plastiques stériles. Les échantillons se sont ensuite transportés dans une glacière au Laboratoire de microbiologie, Département d'agronomie, Université de Laghouat en vue de leurs analyses.

2. Isolement et purification des Entérocoques

L'isolement des entérocoques est réalisé par la méthode d'enrichissement décrite par Zamudio-Maya et al. (2008) avec des modifications mineures. Commencant par une homogénéisation de 2 g de chaque échantillon de sol dans un sac Stomacher stérile, ensuite, 10 g d'homogénat sont suspendus dans 100 ml d'eau physiologique stérile (0.9 % NaCl), et sont agités pendant 15 mn. Une série de dilutions décimales au 10^{-7} est réalisée, puis 1ml de chaque dilution est inoculé dans 5 ml de milieu Brain Heart Infusion Broth (BHIB). Tous les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 2 à 3 jours.

Pour l'isolement des entérocoques, un aliquote de 0.1 ml de chaque dilution est étalé sur un milieu de culture sélectif « Enterococcus Selective Agar » ou milieu de Slanetz-Bartley en boîte de Petri. Après incubation à 37°C pendant 48h, les colonies présentant des aspects macroscopiques caractéristiques aux entérocoques (couleurs rouge et marron) sont repiquées et purifiées par la méthode des stries sur le même milieu sélectif ESA. Toutes les colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

3. Conservation des isolats

La conservation des souches a été effectuée dans des tubes contenant 5 ml de bouillon BHIB. Après incubation à 37°C pendant 48h, les souches sont gardées à 4°C pour une période de courte durée (4 semaines).

4. Caractéristiques phénotypiques des souches

4.1. Etude morphologique

L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre et l'aspect des colonies. L'aspect microscopique par l'intermédiaire de coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le paroi de ces bactéries.

- **Identification de Gram**

Dans cette étude, la détermination de Gram a été réalisée par deux techniques : la coloration de Gram selon Schaad et al. (2001) et le test de KOH 3% d'après la méthode de Powers (1995). Notons que, les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif, disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules et qui ne sont pas affectés au KOH 3% (absence de viscosité).

4.2. Etude physiologique et biochimique

4.2.1. Le test de catalase

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂ à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène, s'il n'y a pas de bulles c'est une réaction catalase négative (Lévy *et al.*, 1992).

4.2.2. Test de l'hydrolyse d'esculine

Ce test permet la mise en évidence d'une coloration noire sur le milieu gélosé bile-esculine après incubation des cultures à 37 °C pendant 72 h. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture (Facklam et al., 1979). Cette caractéristique est commune aux entérocoques et aux streptocoques du groupe D.

4.2.3. Croissance à pH 9.6

Ce test permet de différencier les entérocoques des streptocoques. Il est réalisé en milieu ESA dont le pH est ajusté à 9.6. La croissance est appréciée par la présence des colonies rouge ou marron après incubation à 37 °C pendant 72 h. Contrairement aux streptocoques, les entérocoques peuvent se multiplier à pH 9.6.

4.2.4. Croissance en présence de 6.5% de NaCl

La croissance des entérocoques en milieu "hypersalé", contenant 6.5 g/l de NaCl (propriété halophile) permet avant tout de les distinguer des streptocoques. Ce test est réalisé en milieu ESA à 6.5% de NaCl. Après incubation à 37 °C pendant 72 h, l'apparition des colonies rouge ou marron sur ce milieu démontrant ainsi leur croissance.

4.2.5. Galerie biochimique miniaturisée

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubules contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de la fermentation de sucres. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 3), et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

- **Mode opératoire**

Préparation et inoculation de la galerie : Une atmosphère humide est créée par répartition de quelques gouttes de l'eau distillée dans les alvéoles. Les micro-tubes sont ensuite inoculés avec une suspension bactérienne très dense préalablement préparée dans 2 ml d'API Suspension Medium.

- les cupules des tests VP à LAP sont remplies avec 100µl de la suspension bactérienne ;
- uniquement les tubes des tests ADH à GLYG sont remplis par la suspension bactérienne ;
- les cupules des tests ADH à GLYG sont remplis par l'huile de paraffine stérile pour créer une anaérobiose.

Les galeries sont ensuite incubées à 37°C en aérobiose pendant 4h00 à 4h30 pour une première lecture et 24h (±2h) si nécessaire pour une deuxième lecture.

Lecture et interprétation : Après 4h d'incubation, les tests suivants nécessitent l'addition de réactifs spécifiques:

- Test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2
- Test HIP : 2 gouttes de NIN
- Tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B

Après 10 min, toutes les réactions sont notées sur la fiche de résultats et interprétées à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**TM. Après 24h, uniquement les réactions ESC, ADH et de RIB à GLYG sont relit (bioMerieux, Marcy l'étoile, France).

5. Recherche de l'activité antifongique

5.1. Matériel fongique

Les sept champignons utilisés dans la recherche de l'activité antifongique des d'entérocoques sont des espèces fongiques responsables des dégâts considérables qu'ils causent aux cultures des céréales et des fruits et des légumes. Les quatre champignons (*Fusarium graminearum* MUCL 53452, *Fusarium moniliforme* MUCL 53645, *Penicillium citrinum* MUCL 31475, *Penicillium expansum* MUCL 29192) sont des souches de référence proviennent de la collection BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms). Deux souches fongiques (*Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, *Aspergillus flavus* NRRL 3251) appartiennent de la collection ARS culture collection (NRRL), tandis que la souche *Aspergillus parasiticus* (CBS 100926) provient de la collection CBS culture collections of micro-organisms.

5.2. Préparation des suspensions fongiques

Pour chaque champignon, l'inoculum doit être préparé à partir d'une culture de 7 jours en milieu PDA à 25°C. Récupérer les spores en imbibant un écouvillon stérile avec du Tween 20 et de le transférer dans 3 ml de solution saline stérile 0.9%. Pour empêcher l'agglutination des spores, mélanger vigoureusement à l'aide d'un vortex la suspension de spores pendant 15-20 secondes, puis transférer le surnageant dans un tube stérile et ajuster la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway, 6405 UV/VIS) à 530 nm pour obtenir une suspension de stock de $0.4-5 \times 10^6$ spores/ml. La DO à laquelle l'inoculum doit être réglé varie en fonction de la taille des spores (voir Annexe n°2). Enfin, préparer une suspension de travail de $0.4-5 \times 10^4$ spores/ml en diluant la suspension mère 1:100 spores dans le milieu d'extrait de malt agar (2% extrait de malt et 0.7 % d'agar). (cf. figure 4).

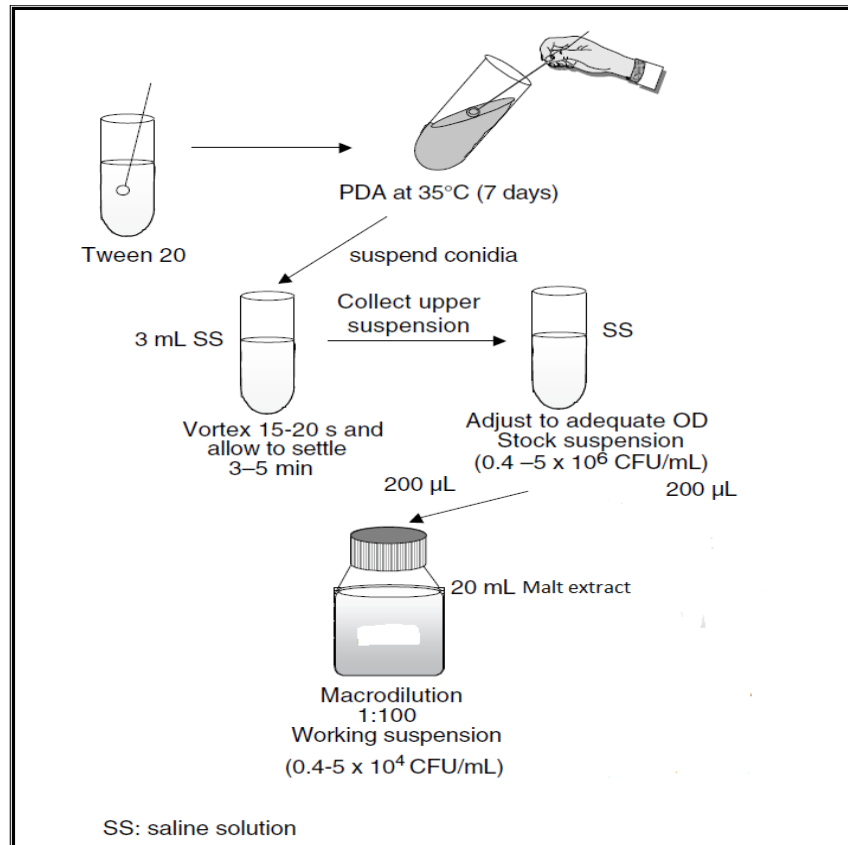


Figure 4: Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode des stries (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007).

5.2. Méthode des stries

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode de double couche 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 contenant 0.1 ml de suspension de spores (10⁴ spores /ml) (cf. figure 5). 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 comprise entre 0.1 à 3% de la surface de la boîte de Pétri ; (++) : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8% de la surface de la boîte de Pétri et (+++) : Zone d'inhibition supérieure à 8% de la surface de la boîte de Pétri.

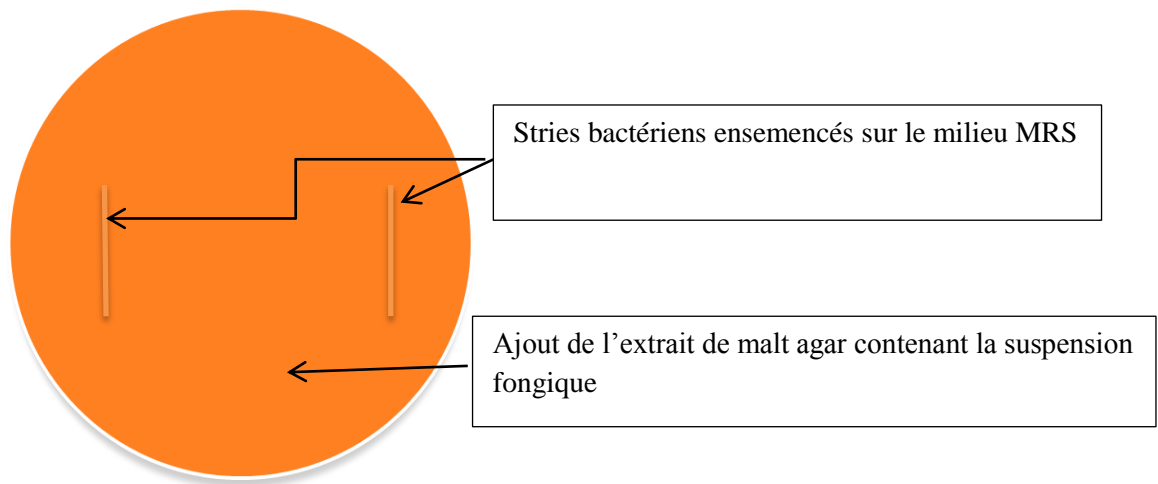


Figure 5: Test de recherche de l'activité antifongique par la méthode des stries

Résultats et discussion

1. Isolement et identification des entérocoques

1.1. Isolement et purification

A partir des 5 échantillons de sol prélevés de la zone rhizosphérique des oliviers, 36 souches ont été isolées et purifiées dont 34 d'entre elles se sont révélées positives à la coloration de Gram et catalase négative. Ces dernières ont été gardées pour la suite de l'étude. Les 2 souches restantes, ne remplissant pas ces propriétés, ont été écartées.

1.2. Identification phénotypique des souches

L'étude macroscopique réalisée sur milieu ESA nous a permis d'observer de petites colonies rouges ou marron, lisses et régulières. L'examen microscopique nous a permis également de sélectionner des bactéries qui présentent une forme de cocci ovoïdes à Gram positif, disposés en courtes chainettes de cellules (cf. figure 6).

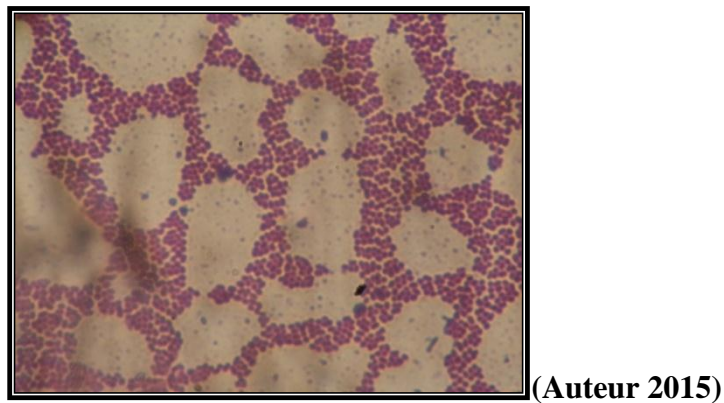


Figure 6: Observation microscopique d'*Enterococcus faecium* après la coloration de Gram (grossissement : 1000 x).

Parmi les 34 souches, 25 d'entre elles ont été choisies pour les tests de l'identification phénotypique. Ces dernières sont capables de croître en milieu ESA à pH 9.6, elles poussent également en présence de 6.5% de NaCl.

De plus, ces isolats hydrolysent l'esculine qui est décelée par une coloration noire au milieu de culture (cf. figures 7 et 8). Cette caractéristique est commune aux entérocoques et aux streptocoques du groupe D.

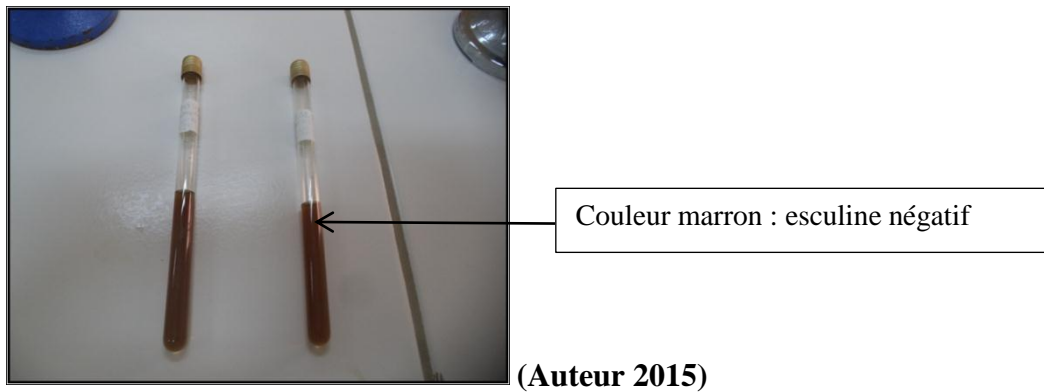


Figure 7: Gélose Esculine avant l'inoculation (Témoin).

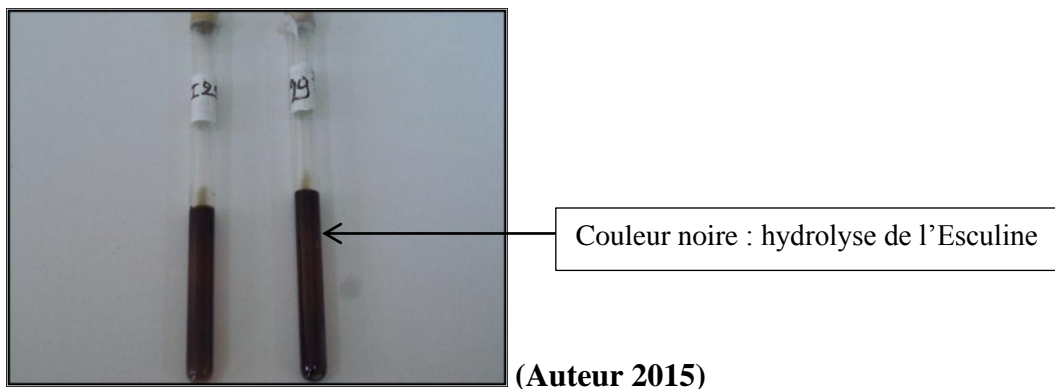


Figure 8: Gélose Esculine après l'inoculation (Réaction positive).

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif et catalase négative, disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules (Bouvet et Cowry, 1994). Ces bactéries sont ubiquistes, se trouvent également sur les plantes, dans le sol et dans plusieurs produits alimentaires artisanaux (Svec et Sedlacek, 1999). La croissance des entérocoques en milieu "hypersalé", contenant 6.5 g/l de NaCl (propriété halophile) permet avant tout de les distinguer des streptocoques, de même que leur capacité à tolérer la présence de 40 % (vol/vol) de bile. En pratique, la gélose bile-esculine permet d'observer la présence d'un halo noir autour des colonies qui sont capables à la fois de se multiplier en présence de bile et d'hydrolyser l'esculine. Ces deux caractères sont partagés par les streptocoques du groupe D comme *S. bovis* et *S. equinus* (Facklam, 1972). Les entérocoques peuvent également se multiplier à pH 9,6 et à des températures de 10° ou 45°C, et survivre après 30 mn de chauffage à 60°C, contrairement aux streptocoques, (Bouvet et Cowry, 1994).

Dans la présente étude, les 25 isolats ont été choisis pour l'identification phénotypique à l'aide des galeries API 20 Strep. La lecture des résultats nous a permis d'identifier 20 isolats *Enterococcus faecium* avec une prédominance de 80%, 4 isolats de *Streptococcus uberis* (16%) et un isolat d'*Enterococcus durans* qui représente 4 % du total des bactéries identifiées (cf. figure 9, tableau 5).

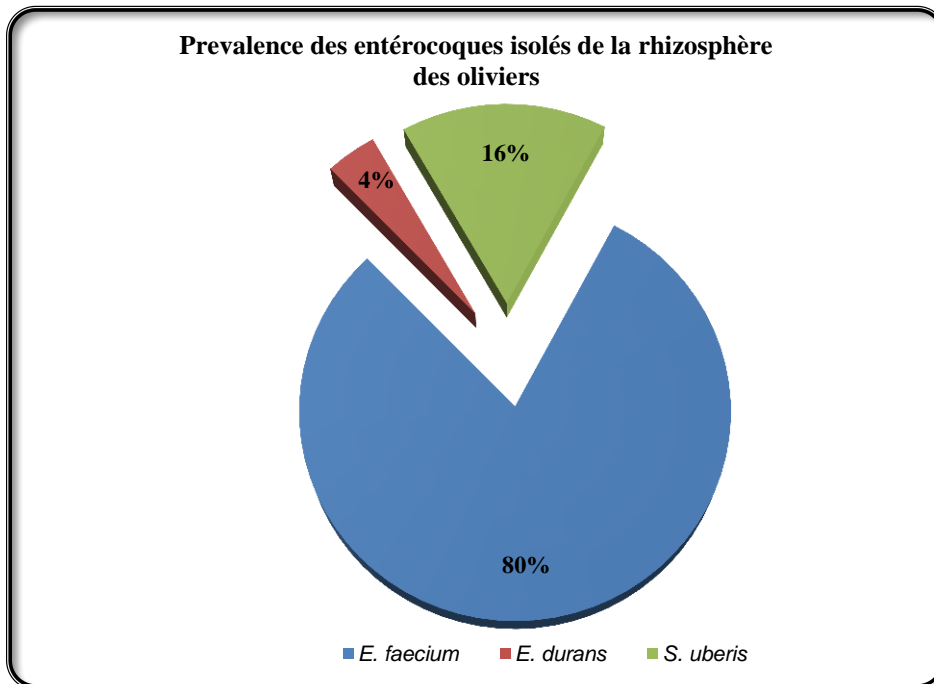


Figure 9: Prévalence des entérocoques isolés de la rhizosphère des oliviers

Les résultats Klibi et al, (2012) ont montré la prévalence de l'espèce *Enterococcus faecium* (97%) et *Enterococcus durans* (3%) isolés de la rhizosphère des oliviers en Tunisie. Bien que leur association fréquente à des échantillons de matières fécales et des produits alimentaires, différentes études ont rapporté la présence d'entérocoques dans les sols (Abriouel, et al, 2008 ; Muller et al, 2001 ; Mutnick et al, 2003 ; Fujioka et al, 1999). La prédominance de cette espèce est probablement due à son large spectre de résistance naturelle et acquise et sa capacité de survivre à haute température et dans des conditions environnementales défavorables (Giard et al, 2001 ; Klare et al, 2003). Ainsi, *E. faecium* semble être plus adaptée à un tel environnement et sa présence pourrait être favorisée par la disponibilité des exsudats racinaires dans cet écosystème spécifique aux racines des plantes (Kiely et al, 2006).

Tableau 5 : Caractéristiques phénotypiques des isolats des entérocoques

Test	Souches		
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
Catalase	–	–	–
Croissance à pH 9.6	+	+	+
Croissance en présence de NaCl 6.5%	+	+	+
Production d'acétoïne (VP)	+	+	+
Hydrolyse			
Acide hippurique	+	+	+
Esculine	+	+	+
Activité			
Pyrrolidonyl Arylamidase	+	+	+
α -Galactosidase	+	+	+
β -Giucuronidase	+	+	+
β -Galactosidase	+	+	+
Phosphatase Alcaline	+	+	+
Dégradation			
L-arginine	+	+	+
Fermentation			
D-ribose	+	+	+
L-arabinose	+	–	+
D-mannitol	+	–	+
D-sorbitol	–	–	+
D-lactose	+	–	+
D-tréhalose	+	+	+
Inuline	–	–	–
D-raffinose	–	–	–
Amidon	+	–	+
Glycogène	–	–	+
Nombre des isolats (%)	20 (80%)	1 (4%)	4 (16%)

Cependant, *Enterococcus durans* appartient au même groupe d'*E. faecium*, elle représente dans cette étude une faible prévalence de 4% par rapport au *E. faecium*. Les bactéries fécales sont connues d'avoir une durée de vie limitée dans l'environnement, ce qui pourrait expliquer en partie l'absence d'autres espèces d'entérocoques caractérisés par leur fragilité, une fois libérés dans le sol (Klibi et al, 2012). En outre, la présence des *Streptococcus uberis* dans les échantillons de sol rhizosphérique avec une prédominance de 16% pourrait être liée à la contamination de sol par les déjections des animaux, plus particulièrement les bovins, car cette bactérie est responsable des mammites infectieuses bovines.

En effet, le tableau 6 montre les résultats des caractéristiques phénotypiques des isolats des entérocoques. La seule différence entre les bactéries identifiées est leur profil de fermentation des sucres (arabinose, mannitol, sorbitol, lactose, amidon et glycogène). Notons que ces souches sont identifiées avec des probabilités de 99, 95 et 87% pour *E. faecium*, *E. durans* et *S. uberis*, respectivement (cf. Annexe 1). Selon Bouvet et Cowry (1994), les caractères discriminatifs les plus importants sont la production d'acétoïne (réaction de Voges-Prokauer), l'hydrolyse de l'arginine, et la fermentation de polyalcools ou de polysaccharides: mannitol, sorbitol, L-arabinose, D-raffinose, saccharose, lactose. *E. faecium* diffère de *E. faecalis* par l'incapacité à utiliser le pyruvate comme source de carbone et - exception faite de quelques rares souches - par l'absence de croissance sur gélose au tellurite de potassium, ainsi que par l'absence de fermentation du sorbitol et par la fermentation de l'arabinose (Facklam et Collins, 1989). Alors qu'*E. durans* diffère d'*E. faecium* par l'absence de fermentation du mannitol, de l'arabinose et du saccharose (Bouvet et Cowry, 1994).

2. Activité antifongique

Sur les 25 souches d'entérocoques identifiées, 8 souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antifongique dont 6 d'entre elles se sont des *Enterococcus faecium*. La production de substances antifongiques envers les 7 champignons phytopathogènes a été recherchée par la méthode de double couche (méthode des stries). Le tableau 6 montre les résultats de l'activité antifongique des souches d'entérocoques sélectionnées pour cette étude. Toutes les souches d'entérocoques testées ont inhibé totalement la croissance de *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* et *Penicillium citrinum* où les zones d'inhibition sont supérieures à 8%. En ce qui concerne *Penicillium expansum* et *Aspergillus ochraceus*, les zones d'inhibitions sont variables selon les souches testées où *E. faecium* I 23 montre une faible activité vis-à-vis *P. expansum* (Zone d'inhibition comprise entre 0.1 à 3%). De plus, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* ont montré une résistance considérable envers les souches *E. faecium* testées (I 23, I 25, I 30 et I 31). Par contre, aucune activité antifongique n'a été détectée pour les souches d'*E. faecium* (I 24 et I 29) et de *Streptococcus uberis* (I 19 et I 21) sur la croissance d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* (cf. figures 10, 11, 12, 13). Cette variation dans l'activité antifongique des différents isolats pourrait être liée aux plusieurs facteurs incluant l'espèce fongique elle-même, la méthode utilisée, le pH du milieu MRS, la nature des substrats présents (glucose, extrait de viande, extrait de levure...), la température et la durée d'incubation.

Tableau 6: Résultats de l'activité antifongique des entérocoques

Souches	Champignons						
	<i>F. moniliforme</i> MUCL 53645	<i>F. graminearum</i> MUCL 53452	<i>P. citrinum</i> MUCL 31475	<i>P. expansum</i> MUCL 29192	<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	<i>A. flavus</i> NRRL 3251	<i>A. parasiticus</i> CBS 100926
<i>E. faecium</i> I 23	+++	+++	+++	+	++	+	+
<i>E. faecium</i> I 24	+++	+++	+++	++	++	–	–
<i>E. faecium</i> I 25	+++	+++	+++	+++	++	+	–
<i>E. faecium</i> I 29	+++	+++	+++	+++	++	–	–
<i>E. faecium</i> I 30	+++	+++	+++	++	++	+	–
<i>E. faecium</i> I 31	+++	+++	+++	+++	++	–	++
<i>S. uberis</i> I 19	+++	+++	+++	++	++	–	–
<i>S. uberis</i> I 21	+++	+++	+++	++	++	–	–

– : absence de zone d'inhibition ; + : Zone d'inhibition comprise entre 0.1 à 3% ; ++ : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8% ; +++ : Zone d'inhibition supérieure à 8%.

En effet, très peu d'études ont examiné l'activité antifongique des entérocoques contre les différentes maladies fongiques. Hadji-Sfaxi et al. (2011) ont rapporté que *E. faecium* PC4.1 inhibe effectivement la croissance de *Cladosporium* et de *Fusarium* spp., par rapport *Penicillium roqueforti* ce qui corrobore avec nos résultats. Laref (2014) ont rapporté que les souches *Lactobacillus plantarum*, produisent des composés antifongiques actifs contre *Aspergillus* sp. *Fusarium roseum*, *Trichoderma* sp. *Penicillium* sp. et *Stemphylium* sp. Peu de données caractérisant les composés antifongiques des entérocoques ou leur mécanisme d'action (Schnurer et Magnusson, 2005) ; l'identification de ces composés peut donner un outil prometteur au biocontrôle des maladies fongiques.

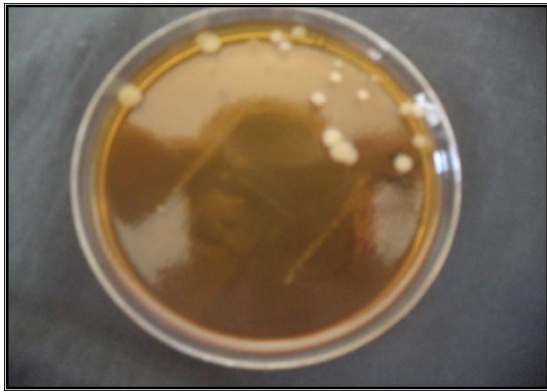


Figure 10: Activité antifongique d'*Enterococcus faecium* (I25) vis-à-vis *Penicillium expansum* (+++).

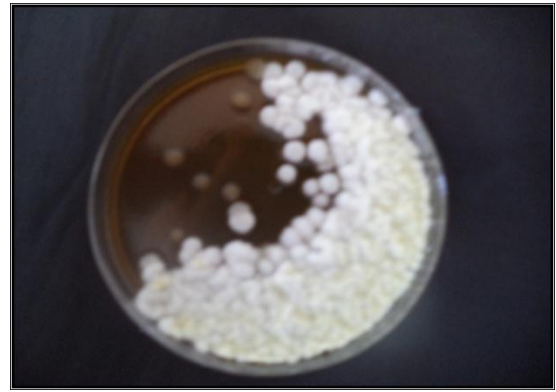


Figure 11: Activité antifongique d'*Enterococcus faecium* (I 31) vis-à-vis *Aspergillus parasiticus* (++).



Figure 12: Activité antifongique d'*Enterococcus faecium* (I25) vis-à-vis *Aspergillus flavus* (+).

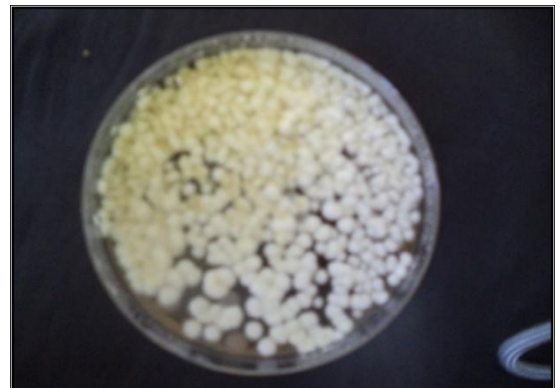


Figure 13: Activité antifongique d'*Enterococcus faecium* (I 30) vis-à-vis *Aspergillus parasiticus* (-).

Les résultats Klibi et al, (2012) ont montré que la majorité des *Enterococcus faecium* isolées de rhizosphère ont la capacité de produire des bactériocines, qui a été partiellement expliquées par la présence des gènes *entA* et *entB*. Javed et al (2011) ont rapporté que *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* sont les espèces prédominantes produisant des bactériocines dans les produits alimentaires. En outre, les entérocoques sont des bonnes acidifiants en présence de sucres disponibles, et l'effet inhibiteur du fait de la production d'acide pourrait être considéré comme un avantage, en plus de la production de bactériocines, est également responsable de la survie et de la colonisation de ces bactéries (Klibi et al, 2012). Les tests de sensibilité de champignon aux acides montre bien l'effet antifongique des acides lactique et acétique. Ces acides et les métabolites antifongiques provoquent des malformations au niveau du mycélium, conidie et conidiophore (mycélium dépourvu de la tête-cas de l'*Aspergillus* sp-, rétrécissement des conidiophores, les spores sont de différentes

formes et leurs taille et nombre sont réduits,...) (Laref, 2014). Sur la base de ces observations, il peut donc être conclu que la production des entérocoques et la sensibilité des champignons aux acides peuvent affecter la croissance des moisissures et provoquer ainsi des malformations au niveau des cellules fongiques.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail nous a permis d'identifier 20 isolats *Enterococcus faecium* avec une prédominance de 80%, 4 isolats de *Streptococcus uberis* (16%) et un isolat d'*Enterococcus durans* qui représente 4 % du total des bactéries isolées de la rhizosphère des oliviers. La prédominance *Enterococcus faecium* est probablement due à son large spectre de résistance naturelle et acquise et sa capacité de survivre à haute température et dans des conditions environnementales défavorables.

Huit souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antifongique par la méthode des stries dont 6 d'entre elles se sont des *Enterococcus faecium*. Toutes les souches d'entérocoques testées ont inhibé totalement la croissance de *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* et *Penicillium citrinum*. Par contre, aucune activité antifongique n'a été détectée pour les souches d'*E. faecium* (I 24 et I 29) et de *Streptococcus uberis* (I 19 et I 21) sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et d'*A. parasiticus*. Ce pouvoir antifongique des entérocoques pourrait être favorisé par leur capacité de produire des métabolites antifongiques et la sensibilité des champignons aux acides produits par ces bactéries.

Malgré son activité antifongique élevée et son probable potentiel d'amélioration de rendement des produits agricoles, l'espèce d'*Enterococcus faecium* isolée de la rhizosphère des oliviers reste moins connue dans le domaine de biocontrôle des agents phytopathogènes. Très peu de données caractérisant les composés antifongiques des entérocoques ou leur mécanisme d'action ; l'identification de ces composés peut donner un outil prometteur au biocontrôle des maladies fongiques.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- Evaluer *in situ* l'efficacité de cet agent de lutte biologique et son potentiel antifongique sur une grande échelle expérimentale (en serres et en champs).

- Isoler et caractériser les composés antifongiques des entérocoques.

- Déterminer le mécanisme d'action des métabolites antifongiques produits par ces bactéries.

Référence bibliographique

Références bibliographiques:

- **Aarestrup F.M. et al. (2000).** Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, n. 37, p.127–137.
- **Abriouel H. et al. (2008).** Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 123, p. 38–49.
- **Acar J.F. et al. (1988).** Resistance patterns of important Gram-positive pathogens. *J Antimicrob Chemother*, n. 21, p. 7-41.
- **Adebayo C.O., Aderiye B.L. (2010).** Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. *Research Journal of Microbiology.*, n. 5, p. 1070-1082.
- **AFSSA. (2006).** *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.* Rapport synthétique.
- **Agrios G.N. (1988).** *Plant Pathology.* San Diego, California: Academic Press. 801 p.
- **Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J. et al. (2012).** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique), *Base* [En ligne], vol. 16, n. 1, p. 67-76.
- **Aliou D., Jan K. (1991).** *Bulletin de service agricole FAO : guide pour établissement des opérations et la gestion des banques de céréales.* FAO. 92p.
- **Altieri M.A. (1999).** The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agri. Ecosystems Environ.*, n. 74, p. 19-31.
- **Andrewes F.W. et al. (1906).** A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet.* p.13-708.
- **APHA, AWWA, WEF. (1998).** *Standard methods for the examination of water and wastewater.* American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation, 20e édition, pagination multiple.
- **Araújo C. et al. (2010).** Vancomycin-resistant enterococci from Portuguese waste water treatment plants. *J. Basic Microbiol.*, n. 50, p. 605–609.

- **Armand B., Germain M. (1992).** *Le blé : éléments fondamentaux et transformation.* Canada: Dominique Johson. 443p.
- **Aymerich T. et al. (2000).** Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J Food Prot*, n. 63, p.721–726.
- **Bain L.J. et al. (1996).** Interaction of structurally diverse pesticides with the human *MDRI* gene product P-glycoprotein. *Toxicol. Applied Pharm.*, n. 141, p. 288-298.
- **Barinaga M. (1990).** Where have all the froggies gone ? *Sci*, n. 247, p.1033-1034
- **Belyagoubi L. (2006).** *Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales.* Thèse de magistère en biologie: Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 110p.
- **Benbrook C.M. et al. (1996).** *Pest management at the crossroads.* Consumers Union, Yonkers. 272p.
- **Benítez T. et al. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.*, n. 7, p. 249-260.
- **Bennik M. et al. (1998).** A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1373, p. 47-58.
- **Berg G. et al. (2000).** Successful strategies for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilt. *Can. J. Microbiol.*, n. 46, p. 1128-1137.
- **Besnard O., Davet P. (1993).** Mise en évidence de souches de *Trichoderma spp.* A la fois antagoniste de *Pythium ultimum* et stimulatrice de la croissance., n. 13, p. 413-421.
- **Blaustein A.R. et al. (1990).** WAKE. 1990. Declining amphibian populations :a global phenomenon ? *Trends Ecol. Evo.*, n. 5, p. 203-205.
- **Bosley G.S. et al. (1983).** Rapid identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, n. 18, p. 7-1275.
- **Bouix M., Leveau, J.Y. (1993).** *Microbiologie Industrielle- les micro-organismes d'intérêt industrielle.2 : Les moisissures.* Paris : Tec&doc-Lavoisier. 612 p.
- **Bouvet A., Cowry G. (1994).** Identification des entérocoques en microbiologie clinique. *Méd Mal Infect.*, n. 24, p. 132-140.
- **Brimner A., Boland G.J. (2003).** A review of the non-target effects of fungi used to biologically control of plant diseases. *Arg. Ecosyst. Environ.*, n. 100, p. 3-16.

- **Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentations, Lavoisier.
- **Caplice E., Fitzgerald G.F. (1999).** *Int. J. Food Microbiol.*, n. 50, p. 131-149.
- **Carbonell E. et al. (1995).** Chromosomal aberration and sister-chromatid exchanges as biomarkers of exposure to pesticides. *Clinical Chem.*, n. 41, p. 1917-1919.
- **CEAEQ. (2000).** *Recherche et dénombrement des entérocoques: méthode par filtration sur membrane*. Centre d'expertise en analyse environnemental du Québec. Gouvernement du Québec, 27 p.
- **Chen H. et al. (2003).** Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, n. 2, p. 82-100.
- **Christensen C.M. (1982).** *Microflora. Chapitre 9*. In Christensen, C.M. (Ed.). *Storage of cereal grains and their products*. St. Paul: American Association of cereal Chemists, p. 219-240.
- **Cleveland J. et al. (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, n. 71, p.1–20.
- **Collins M.D. et al. (1989).** *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett*, n. 57, p. 8-283.
- **Compant S. et al. (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 71(9), p. 4951-4959.
- **Cook R.J. (1993).** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, n. 31, p. 53–80.
- **Cools D. et al. (2001).** Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil. Microbiol.* , n. 17, p. 53–62.
- **Corbaz R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes*.
- **Davet P. (1996).** *Vie microbienne du sol et production végétale*. 1ère édition. Paris : INRA.
- **De Graef E. et al. (2003).** Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* as a junior synonym of *Enterococcus villorum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, n. 53, p. 1069-1074.

- **De Kwaadsteniet M. et al. (2005).** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram⁺ and Gram⁻ bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 105, p. 433-444.
- **Devriese L. et al. (1987).** Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, n. 37(3), p. 257-259.
- **Dortu C. et al. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, p. 13, p. 143-154.
- **Driesche Van R.G., Bellows T.S. (1996).** *Biological control*. U.S.A: Chapman and Hall.
- **Elad Y., Kapat A. (1999).** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, n. 105, p. 177-189.
- **Eldar A. et al. (1996).** *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, n. 32(2), p. 85-88.
- **El-Tarabily K.A. et al. (1997).** The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pythium coloratum*, by Streptomyces and non-Streptomyces actinomycetes. *New Phytologist*, n. 137, p. 495-507.
- **Emmert E.A.B., Handelsman J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.*, n. 171, p. 1-9.
- **Ennahar S. et al. (2005).** Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, n. 55, p. 589-592.
- **Errakhi R. (2008).** *Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre Sclerotium rolfsii et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense*. Thèse de Doctorat : Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
- **Erwin. D.C. (1973).** Systemic fungicides : disease control, translocation, and mode of action. *Ann. Rev. Phytopathol.*, p. 389-422.
- **Espinel-ingroff A., Caton E. (2007).** Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A.C. (Eds). *Antifungal susceptibility testing protocols*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. p. 210-240.

- **Evans E. (1971).** Systemic fungicides in practice. *Pestic. Sci.*, n. 2, p. 192-196.
- **Fabrice V., Clair D. (2006).** *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées.* Paris : Quae. 817p.
- **Facklam R.R. (1972).** Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied Microbiol*, n. 23, p. 9-1131.
- **Facklam R.R. et al. (1979).** Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media. *J Clin Microbiol.*, 1979 Jun, n. 9(6), p. 665–672.
- **Facklam R.R. et al. (1989).** Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, n. 27, p. 4-731.
- **Facklam R.R. et al. (2002).** History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In Gilmore M.S. et al (ed.). *Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance.* Washington: ASM Press, p. 54.
- **FAO. (1995).** *Les sorghos et les mils dans la nutrition humaine.* n°27. 198p.
- **FAO. (2003).** *Manuel du système de l'analyse des risques-points critiques pour leurs maitrises (HACCP) pour la prévention et contrôle des mycotoxines .*92p
- **Feillet P. (2000).** *Le grain de blé composition et utilisation.* Paris: Ed. INRA. 53p.
- **Fertally S.S. et al. (1987).** Comparison of physiologic tests used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci, and streptococci. *J Clin Microbiol*, n. 25, p. 50-1845.
- **Filtenborg O. et al. (1996).** Molds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, n. 33, p. 85-102.
- **Folli C. et al. (2003).** Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221 p.
- **Franz C. et al. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.*, n. 31(3), p. 293-310.
- **Fravel D.R. (2005).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, n. 43, p. 337-359.
- **Freitas A.R. et al. (2011).** Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalised patients, food products and community sources. *Antimicrob. Agents Microbiol*, n. 38, p. 174–176.

- **Fujioka R. et al. (1999).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *J. Appl. Microbiol. symposium supplement.*, n. 85, p. 83S–89S.
- **Garvie E.I. et al. (1981).** Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zbl Bakt Hyg; I Abt Orig. C2*, p. 299-310.
- **Gelsomino R. et al. (2002).** Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 68(7), p. 3560-3565.
- **Ghraiiri T. et al. (2008).** Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, n. 19, p. 162-169.
- **Giard J.C. et al. (2001).** The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis.*, n. 22, p. 2947–2954.
- **Gray J.W. et al. (1991).** Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.*, n.35, p. 5-1943.
- **Hadji-Sfaxi I. et al. (2011).** Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, n. 22, p. 2020-2027.
- **Helluy S., Holmes J.C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. *Behav. Processes.*, n. 68, p. 99-185.
- **Hesselline. (1976).** Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle. *Rivista Italiana EPPOS.* p. 105-125.
- **Hill R.J. et al. (1971).** Bacteria and etiology of cancer of the large bowel. *Lancet*, n. 1, p. 95-100.
- **Homan W.L. et al. (2002).** Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, n. 40, p.1963–1971.
- **Horraud T. et al. (1991).** La résistance aux antibiotiques et le traitement des infections à entérocoques en 1991. *Lettre Infect.*, n.10, p. 8-315.
- **Horraud T., et al. (1990).** *Streptococcaceae*. In Le Minor L. et al. *Bactériologie médicale*. Paris : Flammarion, n. 1, p. 795-834.
- **Howell C.R., Stipanovic R.D. (1980).** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluterin. *Phytopathol.*, n. 70, p. 712-715.

- <http://photos1.blogger.com/blogger/1562/3203/1600/EFAEC.2.jpg>
- <http://www.cmaj.ca/content/182/11/E505/F1.large.jpg>
- **Inoue T. et al. (2006).** Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, n. 50(4), p. 1202-1212.
- **Javed A. et al. (2011).** Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Ann Microbiol*, n. 61, p. 699–708.
- **Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie. In Lepoivre P. (Eds). *Phytopathology*. Bruxelles : De Boeck.
- **Johnsen L. et al. (2005).** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.*, n. 280(10), p. 9243-9250.
- **Jouany J.P., Yiannikouris A. (2002).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales*, n. 15(1), p.3-16.
- **Kaplan A.H. (1988).** Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J Clin Microbiol* , n. 26, p. 8-1216.
- **Kaufhold A. et al. (1989).** Fewminutes tests for identification of group A streptococci and enterococci with chromogenic substrates. *Zentralbl Bakteriol*, n. 272, p. 5-191.
- **Kaye D. (1982).** Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and *in vitro* susceptibility. *Arch Intern Med*, n. 142, p. 9-2006.
- **Kayser F. (2003).** Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 88, p. 255-262.
- **Kempe J., Sequeira L. (1983).** Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubes with bacteria. *Plant Dis.*, n. 67, p. 499-501.
- **Khamna S., Yokot A., Lumyong S. (2009).** Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, n. 25, p. 649-655.
- **Kiely P.D. et al. (2006).** Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant bacterial interactions in the rhizosphere. *Microb. Ecol.*, n. 51, p. 257–266.

- **Klare I. et al. (2003).** Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 88, p.269–290.
- **Klibi N. et al. (2012).** Genotypic Diversity, Antibiotic Resistance and Bacteriocin Production of Enterococci Isolated from Rhizospheres. *Microbes Environ.* Vol. 27, n. 4, p. 533–537.
- **Kohler W. (2007).** The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, n. 297, p. 133–150.
- **Kolpin D.W. et al. (1998).** The environmental occurrence of herbicides : the importance of degradates in ground water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, n. 35, p. 385-390.
- **Kummerer. K. (2004).** Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, n. 54, p. 311–320.
- **Kuwaki S. et al. (2002).** Antifungal activity of the fermentation product of herbs by lactic acid bacteria against tinea. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, n. 94, p. 401-405.
- **Laref N. (2014).** *L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'Aspergillus sp.* Thèse de doctorat en biologie : Université d'Oran, Oran, Algérie. 78 p.
- **LeBlanc D., (2006).** *Enterococcus. Prokaryotes*, n. 4, p. 175-204.
- **Leclerc H. et al. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, n. 81, p. 459-466.
- **LeClercq R. et al. (1991).** Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*, n. 35, p. 6-1273.
- **LeClercq R. et al. (1992).** Vancomycin resistance gene *van C* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chernother.*, n.36, p. 8-2005.
- **Lepoivre P. (2003).** *Phytopathologie.* Bruxelles : Ed. De Boeck. 428 p.
- **Lévy E. et al. (1992).** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, n. 40. P. 71-163.
- **Longley M. et al. (1997).** Factors determining the effects of pesticides upon butterflies inhabiting arable farmland. *Agric. Ecosyst. Environ.*, n.61, p. 1-12.

- **Lowcock L.A. et al. (1997).** Flow cytometric assay for *in vivo* genotoxic effects of pesticides in green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicol.*, n. 38, p. 241-255.
- **Ludwig W. et al. (1985).** The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol*, n. 131, p. 543-51.
- **Lugauskas A. et al. (2005).** Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Ann Agric Environ Med*, n. 12, p. 253–260.
- **Magan N., Lacey J. (1988).** Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier*, n. 7 (3), p. 245-256.
- **Magnusson J. et al. (2003).** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of acid lactic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, n. 219, p. 129-135.
- **Mahadevan B., Crawford D.L. (1997).** Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbil. Tech.*, n. 20, p. 489-493.
- **Manero A. et al. (1999).** Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 65(10), p. 4425-4430.
- **Mao W. et al. (1998).** Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.*, n. 17, p. 535-542.
- **Martinez-Bueno M. et al. (1994).** Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol*, n. 176, p. 6334–6339.
- **Mazzola M. (2002).** Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuw.*, n. 81, p. 557–564.
- **McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*, n. 25, p. 285–308
- **Mikhael S. (2000).** *Les maladies des semences* . Alexandrie, Egypte :Edition la connaissance.
- **Moenne-lopez Y. et al. (1998).** An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover-Rhizoctonia symbiosis. *Appl. Soil. Ecol.*, n. 7, p. 225-237.
- **Molinié A., Pfohl-Leszkowicz A. (2003).** *Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les*

produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire. Auzeville, Tolosane. *Notes de l'ASEDIS-SO* N°spécial Mycotoxine, p. 9.

- **Monstein H. et al. (1998)**. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology*, n. 144, p. 1171-1179.
- **Morin O. (1994)**. *Aspergillus et aspergilloses: biologie*. Elsevier, Paris. Ed. Techniques Encycl Med Chir, 8-600-A-10.
- **Mukherjee P.K., Nautiyal C.S., Mukhopadhyay A.N. (2008)**. Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. *Soil Biol.*, n. 15 (2), p. 243-262.
- **Muller T. et al. (2001)**. Identification of plant-associated enterococci. *J. appl. Microbiol.*, n. 91, p. 268–278.
- **Multon J.L. (1982)**. *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux*. Paris : Lavoisier Technique & Documentation, V. 1. 576 p.
- **Murray B. (1990)**. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, n. 3(1), p. 46-65.
- **Mutnick A.H. et al. (2003)**. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, n. 46, p. 63–68.
- **Nagendra Prasad M.N., Shankara Bhat S., Sreenivasa M.Y. (2010)**. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*: the causative agent of dieback disease of neem. *Journal of Agricultural Technology.*, n. 6, p. 127-133.
- **Naser S. et al. (2006)**. Reclassification of *Enterococcus flavescens* as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus saccharominimus* as a later synonym of *Enterococcus italicus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, n. 56, p. 413-416
- **Nasraoui B., Lepoivre R. (2003)**. Les champignons phytopathogènes. In Lepoivre P. (Eds). *Phytopathologie*. Bruxelles :De Boeck.
- **Nasraoui B. (2006)**. *Les champignons parasites des plantes cultivées*. Centre universitaire Tunis. 450 p.
- **Nautiyal C.S. (2000)**. Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture. Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. 9-23.

- **Nemes-Kosa S. et al. (1995).** Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil micro-organisms. *J. Applied Bact.*, n. 79, p. 483-491.
- **Nes I et al. (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 70, p. 113-128.
- **Noda F. et al. (1980).** Antagonism Between Osmophilic Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Brine Fermentation of Soy Sauce. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 40, p. 452-457.
- **Pinto B. et al. (1999).** Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, n. 29, p. 258-263.
- **Poeta P. et al. (2006).** Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents*, n. 27, p. 131–137.
- **Poeta P. et al. (2007).** Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet. Microbiol.*, n. 125, p. 368–374.
- **Powers M.E. (1995).** Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 61, 10, p. 3756–3758.
- **Punja Z.K., Utkhede R. (2003).** Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotech.*, n. 21, p. 400-407.
- **Raaijmakers J.M., Vlami M., De Souza T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuw.*, n. 81, p. 537-547.
- **Ribas G. et al. (1997).** Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide. *Environ. Mol. Mutag.*, n. 29, p. 272-276.
- **Riley M.A., Wertz J.E. (2002).** Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, n. 84, p. 357–364.
- **Romalde J.L. et al. (1996).** Host range susceptibility of *Enterococcus* spp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 62, p. 607–611.
- **Russel R.W. et al. (1997).** Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in southern Ontario, Canada, green frogs. *Environ. Toxicol. Chem.*, n. 16, p. 2258-2263.

- **Sabaou N. et al. (1998).** Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse.*, n. 9, p. 147-153.
- **Sánchez J. et al. (2007).** Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.*, n. 117, p. 295-305.
- **Schaad N. et al. (2001).** Initial identification of commungenora. In Schaad n. (Ed. Lab). *Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2ème Ed. St. Paul, M.N : APS Press, p. 1-15.
- **Schleifer K. et al. (1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, n. 34(1), p. 31-34.
- **Schnurer J., Magnusson J. (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, *Trends in food science & technology*, n. 16, p. 70-78.
- **Serrano M.A. et al. (2008).** The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science & Technology.*, n. 19, p. 464-471.
- **Simon H. et al. (1994).** *La protection des cultures*. Paris : Lavoisier –tec. 54p.
- **Singh A. et al. (2003).** Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Cur. Microbiol.*, n. 47, p. 153-158.
- **Spawn R. et al. (1997).** Effects ofalachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream., *Environ. Toxicol. Chem.*, n. 16, p. 785-793.
- **Steffens J.J., Pell E.J., Tien M. (1996).** Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Biotech.*, n. 7, p. 348-355.
- **Svec P., Sedlacek I. (1999).** Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol.* (Praha), n. 44, p. 3–10.
- **Terrain C., Grallet H. (2003).** *Séchage des grains en organisme stockeur: guide pratique*. ARVALIS institut du végétal et FFCAT, p. 1-5.
- **Thiercelin M.E. (1899).** Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C R Soc Biol.* n. 5, p. 71-269.
- **Thomashow L.S., Bonsall R.F., Weller D.M. (1997).** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In Hurst C.J., Knudsen G.R. et al. (Eds). *Manual of environmental microbiology*. Washington: ASM Press, p. 493-499.

- **Todorov S. et al. (2005).** An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, n. 25, p. 508-513.
- **Toussaint V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maîtrise en sciences : Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- **Trejo-Estrada S.R., Paszczyński A., Crawford D.L. (1998).** Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, n. 21, p. 81-90.
- **Tu J.C. (1988).** Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. phytopathol.*, n. 121, p. 97-102.
- **Turcotte C. et al. (2004).** A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 90, p. 283-293.
- **Valueva T.A., Mosolov V.V. (2004).** Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.*, n. 69, p. 1305-1309.
- **Van Belkum . et al. (2000).** Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, n. 17, p. 323-335.
- **Vanachter A., Van Wembeke E., Van Assche C. (1983).** Potential danger for infection and spread of root disease of tomatoes in hydroponics. *Acta Hort.*, n. 133, p. 119-127.
- **Vincent C., Panneton B., Fleurat-Lessard F. (2000).** *La lutte physique en phytoprotection*. INRA, Paris 2000 – ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0918-2.
- **Wachsman M. et al. (1999).** Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, n. 12, p. 293-299.
- **Wachsman M. et al. (2003).** Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. *Antiviral Res.*, n. 58, p. 17-24.
- **Whipps J.M. (1997).** Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. In Callow J.A. (Ed.). *Advance in Botanical Research*. UK: Academic Press, p. 1-134.

- **Whipps J.W. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, n. 52, p. 487-511.
- **WHO (World Health Organization). (1995).** *Methyl bromid, environmental health.* Criteria 166. Geneva.
- **Wicken A.J. et al. (1963).** Structure of intracellular teichoic acids from group D streptococci. *Biochem J*, n. 87, p. 54-62.
- **Xiao K., Kinkel L.L., Samac D.A. (2002).** Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol. Control.*, n. 23, p. 285-295.
- **Zaid N., Pierre G. (2011).** *Danger dans l'assiette.* Paris : Quae. 184p.
- **Zamudio-Maya M., Narvaez-Zapata J., Rojas-Herrera R. (2008).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential selective medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, n. 46, p. 402–407.
- **Zendo T. et al. (2005).** Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.*, n. 99, p.1181-1190.

Annexes

ANNEXE 1 : Résultats de l'identification phénotypiques des entérocoques par les galeries API 20 Strep



Figure 14: *Enterococcus durans*
(Probabilité de 95%).



Figure 15: *Streptococcus uberis*
(Probabilité de 87%).



Figure 16: *Enterococcus faecium*
(Probabilité de 99%).

ANNEXE 2 : Les plages de la densité optique et la taille de l'inoculum pour les moisissures communes et rares

Espèces	OD Range (%T)^a	10⁶ CFU/ml. Range
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.09-0.11 (80-82)	1.1-2
<i>A. flavus</i>	0.09-0.11 (80-82)	0.4-4
<i>A. fumigatus</i>	0.09-0.11 (80-82)	0.6-5
<i>A. terreus</i>	0.09-0.11 (80-82)	0.9-5
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	0.2-0.3	0.07-0.4
<i>B. spicifera</i>	0.2-0.3	0.3-3
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0.15-0.17 (68-70)	0.4-3.1
<i>Dactylaria constricta</i>	0.15-0.17 (68-70)	0.4-1
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.15-0.17 (68-70)	0.8-5
<i>F. solani</i>	0.15-0.17 (68-70)	0.5-5.9
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.09-0.13	0.8-2.3
<i>P. variotii</i>	0.09-0.11 (80-82)	ND
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0.15-0.17	0.4-3.2
<i>R. arrhizus</i>	0.15-0.17	0.4-2.6
<i>S. prolificans</i>	0.15-0.17	0.6-1.7
<i>S. schenckii</i>	0.09-0.11	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.09-0.11	0.7-2.3
<i>Wangiella dermatitidis</i>	0.15-0.17	1.2-3.7

%T=pourcentage de transmission.

Source : Espinel-Ingroff et Cantón, 2007

ANNEXE 3 : Tableau de lecture de la galerie API 20 Strep (bioMerieux, Marcy l'étoile, France).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β -naphtylamide	0,0256	PYRroldonyl Arylamidase	ZYMA + ZYMB / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α -D-galactopyranoside	0,0376	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GUR	acide naphtol-ASBI-glucuronique	0,0537	β -GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
β GAL	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	0,0306	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RiBoSe)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

ANNEXE 4 : Composition des milieux de culture

Milieu ESA

- Tryptose 20.0 g
- Extrait de levure 5.0 g
- Glucose 2.0 g
- phosphate dipotassique 4.0 g
- L'azoture de sodium 0.4 g
- 2,3,5- chlorure de triphényltétrazolium 0.1 g
- Agar 10.0 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH = 7.2

Milieu BHIB

- Infusion coeur-cervelle (matières solides) 8,0 g
- Digestion peptique de tissu animal 5,0g
- Digestion pancréatique de caséine 16,0g
- Chlorure de sodium 5,0g
- Glucose 2,0g
- Phosphate d'hydrogène disodique 2,5g
- Gélose 13,5g
- Eau distillée 1000 ml
- pH = 7,4

Milieu BHIA

- Infusion coeur-cervelle (matières solides) 8,0 g
- Digestion peptique de tissu animal 5,0g
- Digestion pancréatique de caséine 16,0g
- Chlorure de sodium 5,0g
- Glucose 2,0g
- Phosphate d'hydrogène disodique 2,5g
- Gélose 13,5g
- Sang de mouton défibriné 10 %
- Eau distillée 1000 ml

Milieu PDA

- Glucose 20 g
- Pomme de terre 200 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH = 6,5

Milieu MRS

- Polypeptone 10.00 g
- Extrait de viande 10.00 g
- Extrait autolytique de levure 5.00 g
- Glucose 20,00 g
- Tween 80 1.08 g
- Phosphate dipotassique 2.00 g
- Acétate de sodium 5.00 g
- Citrate d'ammonium 2.00 g
- Sulfate de magnésium 0.20 g
- Sulfate de manganèse 0.05 g
- Agar bactériologique 15.00 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH = 5,7