

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI TIZI-OUZOU**  
**Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques**  
**Département de Biochimie et Microbiologie**



**Filière : Sciences Biotechnologiques**  
**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

Mémoire de fin de cycle en vue  
de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

**Thème**

**Evaluation de la formation de biofilm de  
*Bacillus cereus* isolée du lait de vache cru et  
recherche des molécules anti-biofilm.**

**Présenté par :**

**Melle MOKRANI Souad**

**Melle NECHAF Sarah**

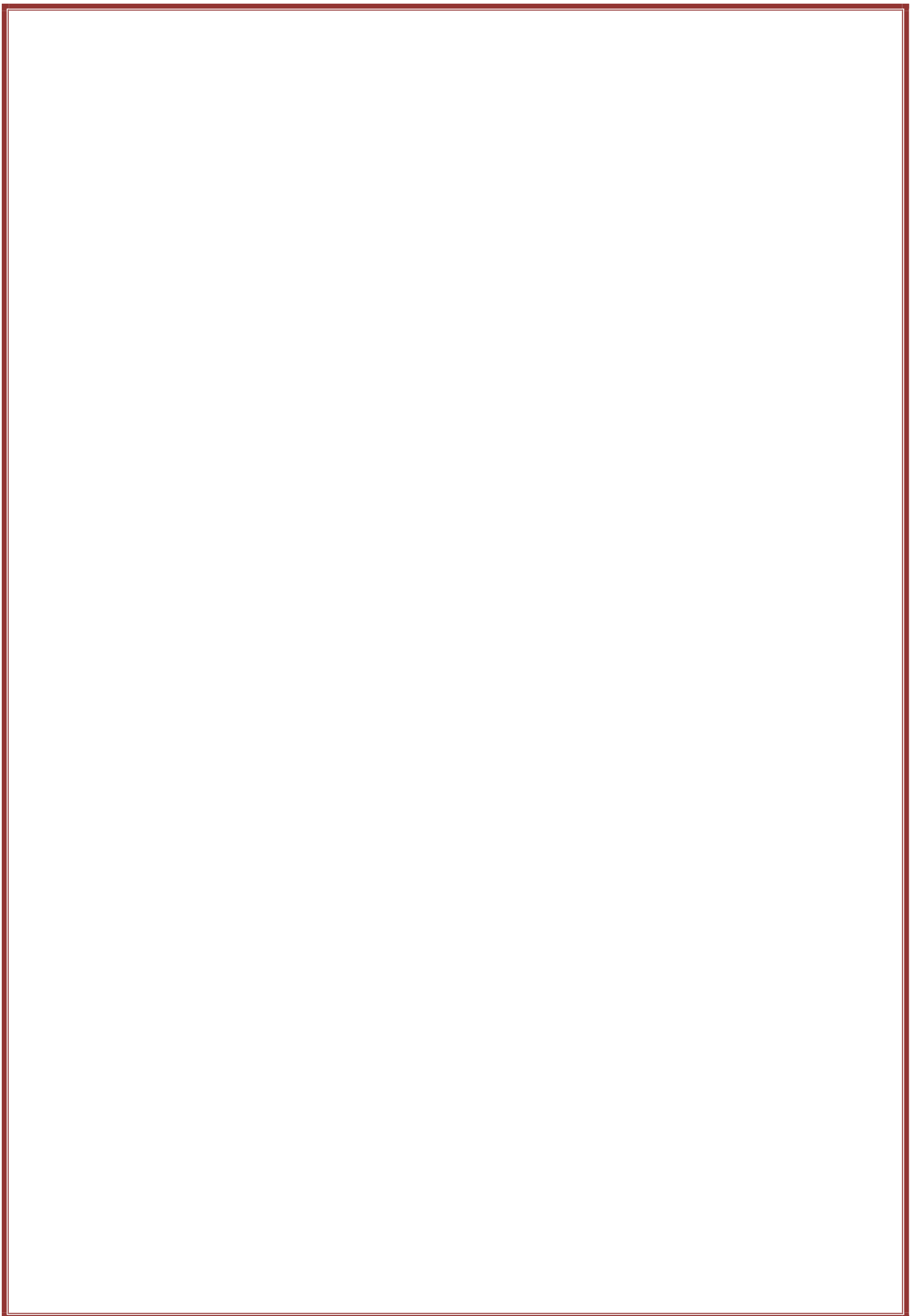
**Devant le jury :**

<b>Mr Metahri M.S.</b>	Maitre de conférence "A" à l'UMMTO	Président
<b>Mme Afif Chaouche T.</b>	Maitre de conférence "B" à l'UMMTO	Promotrice
<b>Mme Ben Ahmed Djillali A.</b>	Maitre de conférence "A" à l'UMMTO	Examinatrice

**Année universitaire : 2019/2020**







## **Remerciements**

On tient tout d'abord à remercier le bon Dieu de nous avoir aidé à réaliser cette tâche. Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Mme Afif Chaouche de nous avoir fait l'honneur d'encadrer, sa disponibilité et ses précieux conseils ainsi son soutien nous ont poussé à achever la recherche dans le temps voulu.

Nous tenons à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail : le président de jury Mr Metahri et l'examinatrice Mme Ben Ahmed Djillali

On remercie tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions enfin tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu de m'avoir accordé des connaissances de la science et de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Avant tous, je dédie ce travail :

A tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, qu'ils trouvent ici gratitude pour leur soutien, leur confiance en moi, leur amour, leur encouragements, leur sacrifices pour notre instruction.

A mon chère frère : Rayane, je te souhaite la réussite dans ta vie.

A ma grand-mère, que dieu la garde pour nous.

A tous ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines.

A tout mes amis chaque un par son nom.

A ma chère binôme : Souad.

Sarah

## Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont toujours soutenue en particulier :

À mes très chères parents, qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage tout au long de mes études pour un meilleur avenir

À mes frères Farid, Kamel et Mokran, qui m'ont beaucoup aidé dans la vie et m'ont soutenue

À ma très chère sœur Meriem, pour son amour et son encouragement

À mes grands parents, pour leurs amours et leurs motivations

À ma chère binôme de ce travail : Sarah

À toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

Souad



Sommaire	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des Tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1

### **Chapitre I: Généralité sur le lait de vache cru**

1. Définition .....	3
2. Source de contamination .....	3
3. Caractéristiques physico-chimiques .....	4
4. composition .....	4
4.1. Glucides.....	4
4.2. Protéines .....	5
4.3. Matière grasse .....	5
4.4. Minéraux .....	5
4.5. Vitamines .....	5
4.6. Enzymes .....	6
5. Microbiologie .....	6
5.1. Flore indigène ou originelle .....	6
5.2. Flore de contamination.....	6
5.2.1. Flore pathogène .....	7
5.2.2. Flore d'altération .....	7

### **Chapitre II : Généralités sur *Bacillus sp* et biofilms**

1. Généralités sur <i>Bacillus sp</i> .....	8
2. <i>Bacillus cereus</i> .....	8
2.1. Caractéristiques .....	9
2.2. Pathogénicité .....	10
3. Biofilm .....	11
3.1. Etapes de formation de biofilm .....	11
3.1.1. Conditionnement de surface .....	12
3.1.2. Adhésion .....	12

3.1.3. Croissance .....	12
3.1.4. Maturation .....	12
3.1.5. Dispersion.....	12
4. Biofilms en industrie agroalimentaire .....	13
5. Stratégies de lutte contre les biofilms en industrie alimentaire .....	14
6. Nettoyage et désinfection en industrie alimentaire .....	15
6.1. Nettoyage .....	15
6.2. Désinfection .....	16

### **Chapitre III : Généralités sur les bactéries lactiques**

1. Définition et caractéristiques.....	17
2. Classification.....	18
3. Bienfaits .....	19
4. Application et rôles .....	19
5. Activité antimicrobienne .....	19
5.1. Acide lactique.....	20
5.2. Diacétyle.....	20
5.3. Peroxyde d'hydrogène .....	20
5.4. Reutéline .....	20
5.5. Bactériocines .....	20
6. Activité antibiofilm .....	21
7. Condition de culture .....	21

### **Chapitre IV : Généralités sur les champignons endophytes**

1. Définition .....	23
2. Diversité .....	23
3. Classification.....	23
4. Importances et rôles .....	23
5. Métabolites secondaires .....	24
6. Activité antibiofilm .....	24
Méthodologie .....	26
Conclusion .....	27
Référence bibliographiques .....	28

Annexes



## Liste des figures

Figure 1 : Bacillus cereus : cellule végétative contenant des endospores à l'intérieur observée sous microscope optique .....	9
Figure 2 : les deux types d'intoxication possibles par B.cereus.....	10
Figure 3 : biofilm de Bacillus cereus .....	11
Figure 4: étapes de formation de biofilm. ....	13
Figure 5 : bactérie lactique sous forme de bacilles arrondés (A), de bacilles (B) ou de coques (C), colorée au bleu de méthylène.....	17

## Liste des Tableaux

Tableau 1: caractéristiques physico-chimiques du lait en valeur moyenne .....	4.
Tableau 2: composition moyenne de lait de vache. ....	4
Tableau 3 : choix de détergent en fonction de types de souillures.....	15
Tableau 4 : mode d'action des principaux désinfectants .....	16
Tableau 5 : Taxonomie et les clés de différenciation des bactéries lactiques.....	18

## **Liste des Abbreviations**

CIP : cleaning in place

Cyt K : cytotoxine

EPS : exopolysaccharide

HBL : enterotoxine hémolysine

Nhe : enterotoxine non hemolytique

pH : potentiel d'hydrogène

# **Introduction**

## Introduction

Le lait est considéré comme un produit de base dans la consommation humaine. Il occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population (yakhlaf *et al.*, 2010). De part ces composants nobles et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium (Vignola, 2002), il constitue un milieu favorable pour le développement des microorganismes (Mennad, 2017).

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle, cette dernière peut-être à l'origine des contaminations par des bactéries pathogènes y compris *Bacillus cereus* qui est connue pour être particulièrement virulente et qui peut résister au traitement thermique grâce à leur spores résistantes (Dromigny, 2007).

Le mode de vie bactérien alterne entre la forme planctonique et la forme sessile connue également par le « Biofilm ». La capacité de se développer en Biofilm présente un caractère dominant chez la majorité des bactéries. Ce mode de vie permet aux bactéries de persister et de faire face à certaines hostilités rencontrées dans leur environnement (Diaz *et al.*, 2015), leur développement dans le lait contribue à une dégradation de sa qualité organoleptique et à sa détérioration rapide limitant sa durée de conservation (Bonfoh *et al.*, 2005).

Les bactéries lactiques par leur diversité sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire (Lairini *et al.*, 2014). Actuellement les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence de micro-organismes indésirables et nuisibles grâce à la production des métabolites ayant un effet antimicrobien et antibiofilm.

Les champignons endophytes sont des champignons qui colonisent les tissus vivants, des plantes, sans causer des symptômes apparents. Ils sont estimés au nombre de 1.5 millions d'espèces et seulement environ 75000 d'entre elles sont décrites (Manoharachary *et al.*, 2005). Ils reçoivent la nutrition et la protection de la plante hôte et, en retour, ils améliorent la compétitivité ainsi que la résistance de celle-ci aux différents agents pathogènes tels que les bactéries, champignons, parasites, insectes... ainsi qu'aux différents types de stress abiotiques (Saikkonen *et al.*, 1998), grâce à cette protection les champignons endophytes ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs.

Dans ce contexte, l'objectif principal assigné à ce travail est d'évaluer la formation des biofilms dans le lait de vache cru, principalement par des espèces sporogènes appartenant au groupe de *Bacillus cereus* et recherche des molécules antibiofilms.

Ce travail est composé :

- ✓ D'une synthèse bibliographique mettant en exergue les notions générales de la composition du lait de vache, les germes qui s'y trouvent, les biofilms et certaines molécules antibiofilms.
- ✓ D'une partie de méthodologie utilisée pour évaluer l'effet antibiofilm.



## **Synthèse bibliographique**

## Chapitre I : Généralités lait de vache cru

### 1. Définition

Le lait est un produit très complexe. Il est très riche en nutriments et en oligo-éléments (Mansour, 2015).

Le lait représente un élément fondamental de la traite d'une femelle laitière à partir des glandes mammaires, comme la vache, la chèvre, la brebis... Il est destiné à l'alimentation du jeune animal naissant ainsi qu'à l'alimentation humaine qui leur fournissent un aliment complet surtout au cours des premières années de la vie (Vignola, 2002; Velázquez-Ordóñez *et al.*, 2019).

Le lait de vache cru renferme un aliment de consommation qui ne subit aucun traitement sauf la réfrigération à la ferme (Farougou *et al.*, 2011).

Il constitue un fluide aqueux, blanc mat, opaque, plus ou moins jaunâtre.

### 2. Source de contamination

Le marché du lait exige et propose des produits de haute qualité, et cela demande de bonnes pratiques d'hygiène afin d'empêcher la contamination. De ce fait on distingue diverses sources de contamination (Velázquez-Ordóñez *et al.*, 2019) :

- Produit chimique issu de l'agriculteur;
- Résidus de pesticides;
- Résidus de médicaments vétérinaires;
- Gestion de troupeau de vache;
- Mauvaise pratique d'hygiène du lait et de la mammité;
- Pis contaminé par les matières fécales, le lisier, le sol, la boue ;
- Personnel de traite ;
- Air ambiant dans la salle de traite ;
- Approvisionnement en eau ;
- Matériel de traite, longue période de stockage, sous une température insuffisante.

### 3. Caractéristiques physico-chimique

On distingue différents paramètres physico-chimiques du lait à savoir la température, pH, densité, matière sèche, cendres, acidité, ces paramètres ainsi que leurs valeurs moyennes sont résumés dans le tableau ci-dessous (Taybi *et al.*, 2014).

**Tableau 1:** caractéristiques physico-chimiques du lait en valeur moyenne (Taybi *et al.*, 2014).

Paramètre	Valeur moyenne
Densité	1.0291
Ph	6.26
Matière sèche (g/l)	122.92
Cendres (g /l)	6.44

### 4. Composition

Le lait de vache est constitué d'eau, glucides, lipides, protéines, sels minéraux, enzymes en trace, vitamines et oligoéléments (Pougheon, 2001). La valeur moyenne de ces constituants est résumée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2:** composition moyenne de lait de vache (Vignola, 2002)

Constituants Majeur	Valeur moyenne (%)
Eau	87.5
Matière grasse	3.7
Protéines	3.2
Glucides	4.6
Minéraux	0.8

#### 4.1. Glucides

Le lait contient deux types de glucides :

- Glucides libres
- Glucides combinés ou glycoprotéine

Les glucides sont essentiellement représentés par le lactose qui est un disaccharide constitue de galactose et de glucose. Le lactose est synthétisé à partir du glucose sanguin, il est fermentable par de nombreux microorganismes (Pougheon, 2001).

### 4.2. Protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes, et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers (Vignola, 2002).

On les classe en deux catégories selon leur solubilité dans l'eau (Pougheon, 2001) :

- Caséines : sont en suspension colloïdale et précipitent sous l'action de la présure ;
- Lactosérum : précipite sous l'action de la chaleur.

### 4.3. Matière grasse

La matière grasse se compose principalement de triglycérides, phospholipides et une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et B- carotène.

Les matières grasses ont la forme de petites globules sphériques, la dimension de ces derniers varie selon l'espèce, la race et la période de lactation. Ces lipides sont aussi riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés (Vignola, 2002).

### 4.4. Minéraux

Le lait contient des éléments minéraux indispensables à l'organisme, citant calcium, magnésium, potassium, sodium et chlore.

Ces minéraux se trouvent sous deux formes :

- Sous forme de sels ionisés, solubles dans le sérum ;
- Sous forme micellaire insoluble (Vignola, 2002).

Le lait de vache contient aussi des oligoéléments indispensables tels que le zinc, le fer, le cuivre, le fluor, l'iode et le molybdène (Pougheon, 2001).

### 4.5. Vitamines

Selon Vignola (2002), les vitamines sont des substances biologiques indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteur dans leur réaction enzymatique et échanges des membranes cellulaires.

On distingue deux classes selon leur solubilité :

- Vitamines hydrosolubles (B et C)
- Vitamines liposolubles (A, D, E et K) associées à la matière grasse.

### 4.6. Enzymes

Ce sont des protéines globulaires spécifiques produites par les cellules vivantes, agissant comme biocatalyseurs. Le lait contient principalement trois types d'enzymes : les hydrolases, les déshydrolases et les oxygénases (Vignola, 2002).

Selon Pougheon (2001), ces enzymes jouent un rôle très important :

- Lyse des constituants du lait, exemple : protéases, lipases ;
- Rôle antimicrobien : lactoperoxydases et lysozymes.

### 5. Microbiologie du lait

Les produits laitiers subissent une fermentation qui contribue à une acidification et une production de bactériocine (empêche la croissance des bactéries pathogènes) ce qui assure une sécurité alimentaire (Taybi *et al.*, 2014).

Les microorganismes présents dans le lait sont utilisés pour la transformation et la conservation du lait (Laithier, 2011).

Selon Mami (2013), les microorganismes du lait sont répartis en deux classes: la microflore indigène ou originelle et la microflore de contamination. Cette dernière est divisée en deux sous classes: la microflore d'altération et la microflore pathogène.

#### 5.1. Flore indigène ou originelle

La flore naturelle du lait est un facteur essentiel particulièrement pour ses propriétés organoleptiques (Foutou *et al.*, 2011).

Le lait se défend de lui-même par sa propre flore qu'il abrite, tel les ferements lactiques comme *Micrococcus sp*, *Lactococcus*, *Streptobacillus* et *Lactobacillus*, qui ont une propriété commune, c'est la fermentation du lactose en acide lactique (Brisabois *et al.*, 1997)

#### 5.2. Flore de contamination

La flore de contamination représente l'ensemble des microorganismes contaminant le lait de la récolte jusqu'à sa consommation (Vignola, 2002). Elle est étroitement dépendante des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées les manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machine à traire) et enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (FAO,

1995). Cette flore peut se composer d'une flore d'altération et d'une flore pathogène (Vignola, 2002).

### **5.2.1. Flore pathogène**

La présence d'une flore pathogène dans le lait et les produits laitiers conduit à des risques sur la santé des consommateurs, cette flore peut causer une libération de toxines (Vignola, 2002).

La contamination par les germes pathogènes peut-être endogène résultant d'une traite mammaire d'un animal malade, comme elle peut-être exogène suite au contact directe des surfaces infectées ou par des apports environnementaux (Brisabois *et al.*, 1997). Parmi les principales bactéries de cette flore pathogène on cite : *Salmonella* ; *Bacillus* ; *Staphylococcus*...

### **5.2.2. Flore d'altération**

Elle est responsable de la dégradation des constituants du lait cru comme les lipides et les protéines, cause aussi des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduit la vie du produit (Beuvier et Feutry, 2005).

Les principaux groupes d'altération sont : *Pseudomonas*, entérobactéries, *Clostridium spp* (Valérie *et al.*, 2002).

### Chapitre II : Généralités sur *Bacillus sp* et biofilms

#### 1. Généralités sur *Bacillus sp*.

Les bactéries du genre *Bacillus* constituent un groupe de bactéries hétérogènes du fait de leur variabilité écologique ainsi que leur diversité taxonomique (Dromigny, 2007).

Elles sont généralement hétérotrophes (Tolazzal *et al.*, 2016), très ubiquitaires, elles colonisent diverses niches écologiques telles que le sol, les légumes cuits et crus, les aliments déshydratés, les produits laitiers, les céréales en particulier le riz, la viande, les œufs et les fruits de mer (Gregory, 2008).

La position taxonomique du genre *Bacillus* est la suivante :

Division des Firmicutes,

Classe des Bacilli,

Ordre des Bacillales,

Famille des *Bacillaceae* (Fritze, 2004).

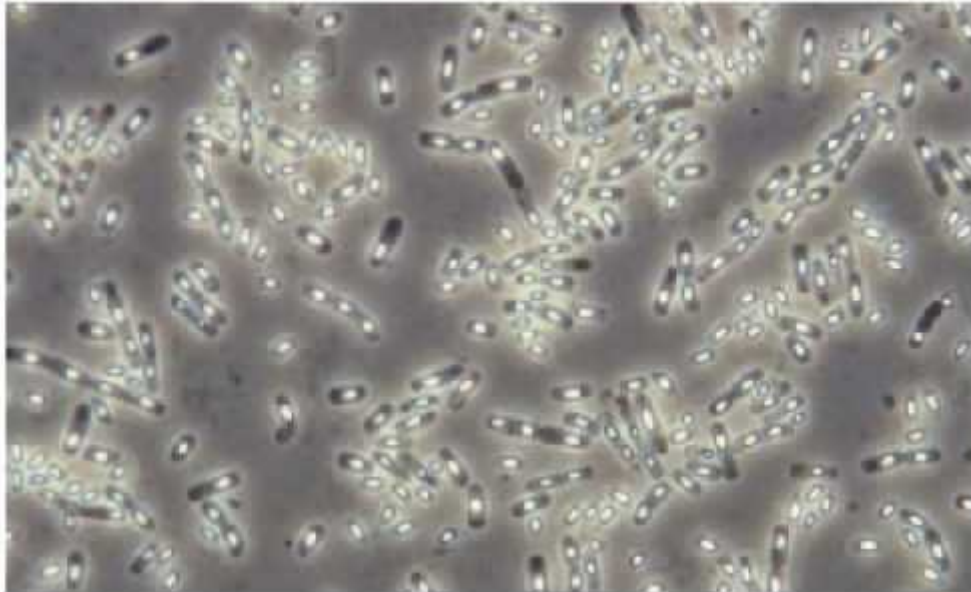
#### 2. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (cereus = adjectif latin, semblable à la cire à cause des colonies que *B.cereus* forme sur la gélose) (Dromigny, 2007).

Bactérie en forme de bâtonnet à Gram positif, sporulée, pathogène opportuniste très répandue dans l'environnement et fréquemment isolée des plantes et des aliments (Stenfors *et al.*, 2008). Elle est mobile avec ciliatures péritriches, anaérobie facultative. Leur croissance est optimale à une température comprise entre 30°C et 37°C (Messelhäusser *et al.*, 2007).

Elle cause des intoxications alimentaires avec des symptômes émétiques et diarrhéique (Racha *et al.*, 2016). Ces bactéries sont considérées comme étant un indicateur d'une contamination tellurique ou environnementale (Antoine, 2016).

La figure suivante représente l'aspect des cellules végétatives de *Bacillus cereus* contenant des endospores observées au microscope optique.



**Figure 1 :** *Bacillus cereus* : cellule végétative contenant des endospores à l'intérieur observée sous microscope optique (Anses, 2011).

### 2.1. Caractéristiques

Les cellules de *Bacillus cereus* présentent des caractéristiques diverses : mobiles par ciliatures péritriches, elles interviennent dans la dégradation de la lécithine par synthèse des lécithinase, acidification d'acétoïne, réduction des nitrates, assimilation du citrate et du formate, fermentation des glucides, elles ne fermentent pas le mannitol (Stenfors *et al.*, 2008).

Elle produit des entérotoxines, hémolysine BL (HBL), non hémolytique (NHe), cytotoxines (K), et des toxines hémolysine HLyI et HLyII ainsi que des enzymes dégradantes comme les phospholipases et protéases (Racha *et al.*, 2016).

Les spores de *B.cereus* sont hydrophobes et très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation, le dessèchement, la congélation, les radiations ainsi qu'aux désinfectants et agents de nettoyage. Elles adhèrent très facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer, elles constituent une préoccupation particulière pendant la transformation des aliments (Yiying, 2020).

La culture de *Bacillus cereus* se fait sur le milieu Mossel, son principe repose sur l'incapacité de fermenter le mannitol (colonies roses) et la mise en évidence de la lécithénase (apparition d'une zone de précipité), l'agent sélectif de ce milieu est le sulfate de polymyxine B.

### 2.2. Pathogénicité

*Bacillus cereus* a la capacité de produire deux types de toxines, provoquant ainsi deux syndromes différents dénommés syndrome diarrhéique et syndrome émétique (Stenfors *et al.*, 2008).

➤ **Syndrome diarrhéique** est causé par l'ingestion de *B.cereus* sous forme de spore ou de cellules végétatives (Stenfors *et al.*, 2008).

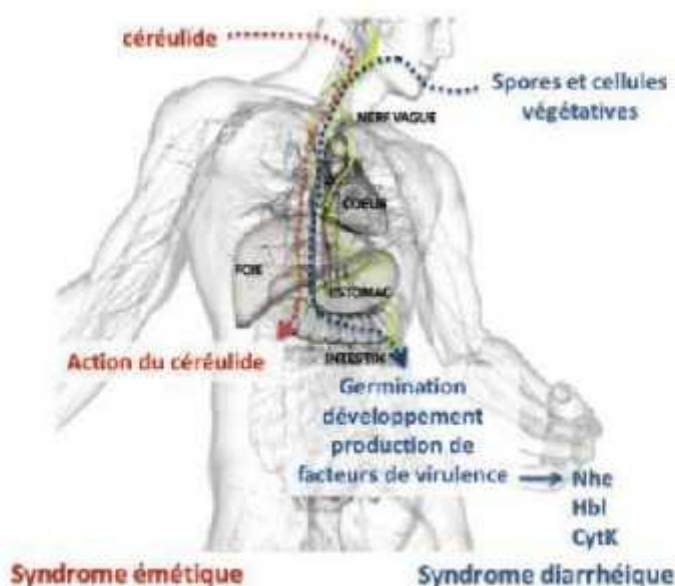
Les symptômes sont dûs à des toxines diarrhéiques (HBL, Nhe, CytK) produits au niveau de l'intestin (figure 2), ces symptômes surviennent après minimum 6h de l'ingestion des produits alimentaires contaminés (Granum *et al.*, 1993; Srenfors *et al.*, 2008). Ces toxines diarrhéiques sont retrouvées principalement dans la viande, le lait ainsi que les produits de la pêche, elles sont produites à des températures inférieures à 4°C (Messelhäusser *et al.*, 2007).

➤ **Syndrome émétique** est dû à la production de toxines appelées céréulide (Agata *et al.*, 1994). Cette toxine est de faible poids moléculaire et stable à la chaleur (Malek, 2019).

Ce syndrome émétique apparaît entre 0,5h et 5h après consommation des produits alimentaires contaminés (Stenfors *et al.*, 2008). Il est caractérisé par l'apparition des crampes abdominales suivies de sévères vomissements (Agata *et al.*, 1995).

La toxine émétique préformée dans l'aliment se transmet directement à l'individu au moment de l'ingestion (figure 2) provoquant ainsi une infection ou une intoxication même si la bactérie n'est pas présente (Stenfors *et al.*, 2008).

Le schéma ci-dessous représente les deux types d'intoxication



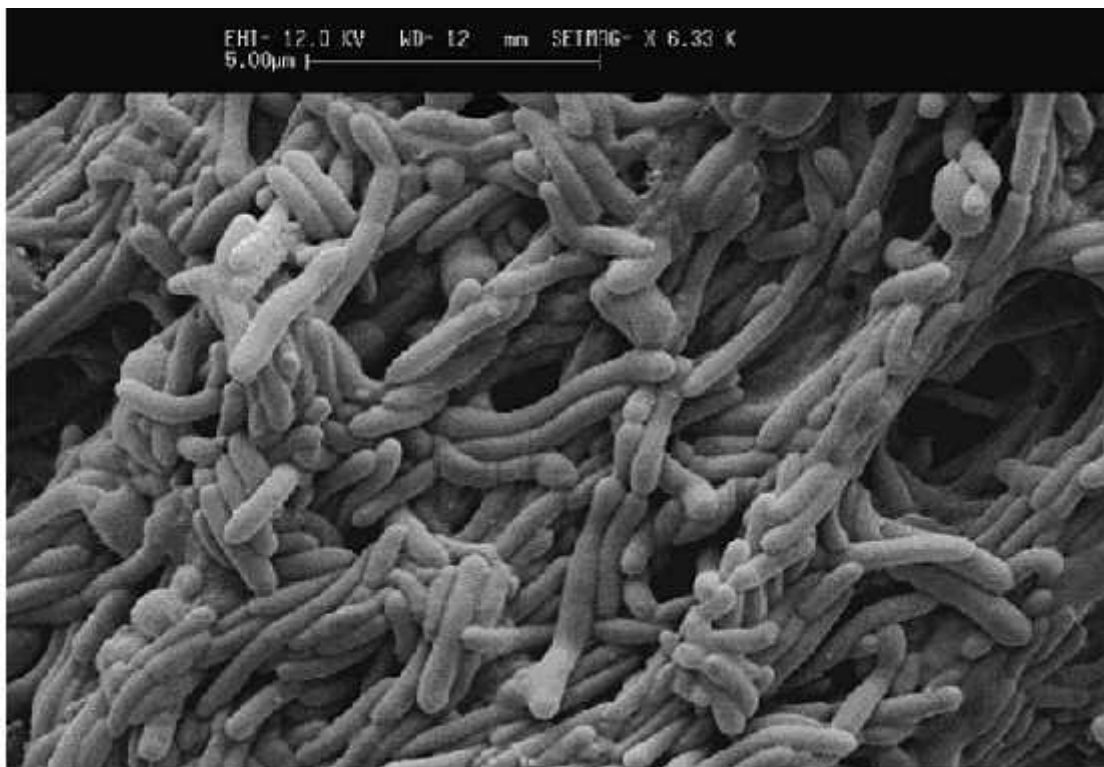
**Figure 2** : les deux types d'intoxication possibles par *B.cereus* (Guerin, 2016).

### 3. Biofilm

Le biofilm est une communauté de bactéries imbriquées dans un réseau de substances polymériques extracellulaires et fixée sur une surface biotique ou abiotique (Tremblay *et al.*, 2014). Il est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des espaces libres dépourvus de bactéries et parcourus par des « canaux » servant de courants aqueux, ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation (Roux et Ghigo, 2006).

C'est une stratégie de survie des microorganismes face aux stress environnementaux négatifs (Yiying, 2020). Le développement de l'architecture de biofilm est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire qui est autoproduite par les bactéries et contient des exopolysaccharides (EPS), des protéines et des acides nucléiques (Racha *et al.*, 2016).

La figure ci-dessous représente un biofilm formé par *B.cereus*



**Figure 3** : biofilm de *Bacillus cereus* (Simoes *et al.*, 2010)

#### 3.1. Etapes de formation de biofilm

La formation de biofilm microbiens passe par plusieurs étapes :

### 3.1.1. Conditionnement de surface

Constitue la première étape de formation de biofilm. Cette étape facilite la fixation et l'attachement des bactéries sur les Surfaces (Merzougui *et al.*, 2013). Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques, organiques ou de composés biologiques de l'environnement (Zottola et Sasahara, 1994), il est produit pendant l'immersion dans un liquide (Verran, 2002).

### 3.1.2. Adhésion

C'est une phase indispensable pour le développement de biofilm, elle constitue l'adhésion des cellules ou des spores de *B. cereus* aux surfaces inanimés grâce aux caractéristiques hydrophobes de leurs Spores (Bayoumi *et al.*, 2012).

L'adhésion est exercée par de nombreux facteurs tels que la physiologie des espèces bactériennes, la nature des surfaces, la disponibilité des nutriments, la composition de la surface cellulaire, la présence d'appendice (pili, flagelle), ainsi que les conditions hydrodynamique (Merzougui *et al.*, 2013).

### 3.1.3. Croissance

Après l'adhésion sur les surfaces, les cellules bactériennes se multiplient de façon exponentielle ce qui conduit à la formation de microcolonies et la construction d'un réseau d'EPS qui procure une liaison entre les cellules de biofilm et améliore la protection des bactéries au sein de biofilm contre différents agents chimiques (Davies *et al.*, 1998 ; Anand *et al.*, 2014).

### 3.1.4. Maturation

Le biofilm dans cette étape engendre des changements phénotypiques et une synthèse polymérique importante, il consiste en une structure complexe suite à la formation des canaux entre les microcolonies permettant la circulation des fluides, des nutriments, acheminement de l'oxygène et élimination des déchets (Roux et Ghigo, 2006).

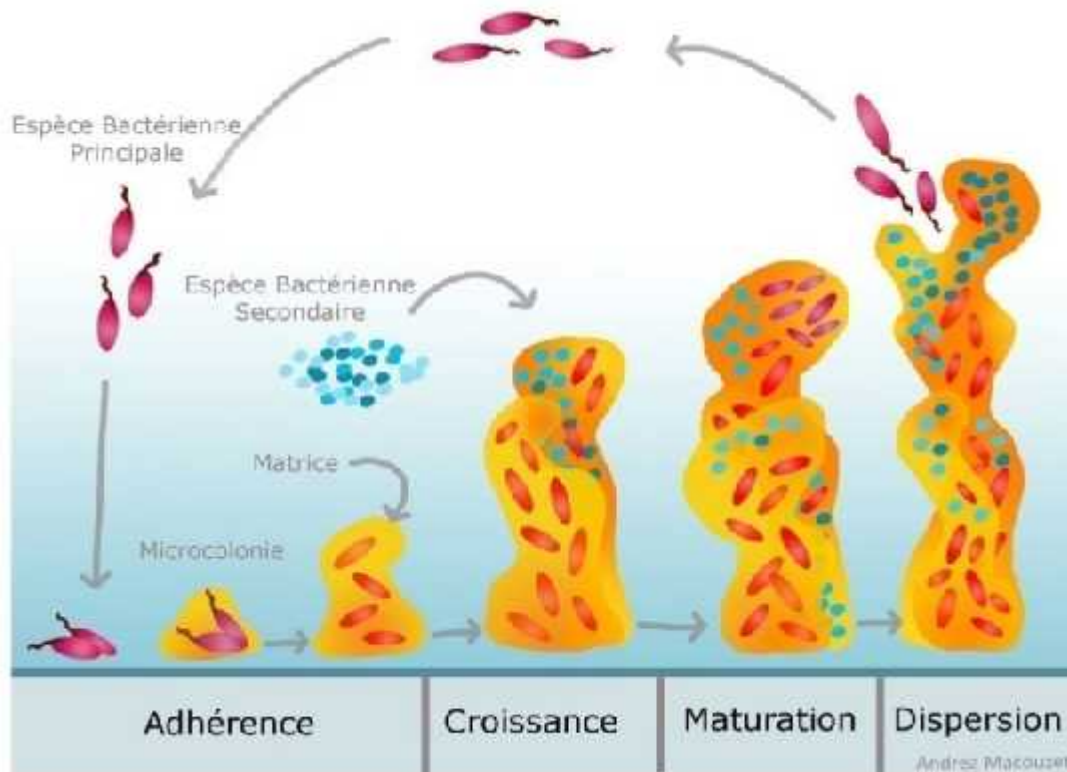
Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal du matériel ce qui facilite la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (Trautner et Darouche, 2004).

### 3.1.5. Dispersion

Quand l'épaisseur du biofilm atteint un seuil maximal, le détachement de quelques bactéries de biofilm peut être initié par différents facteurs tels que les perturbations

mécaniques (forces de cisaillement), la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire ou de substrat sur lequel le biofilm est attaché, production d'agents tensioactifs et disponibilité des nutriments (Tremblay *et al.*, 2014 ; Goetz *et al.*, 2016).

Ces différentes étapes de formation de biofilm sont illustrées dans la figure suivante :



**Figure 4** : étapes de formation de biofilm (Trembay *et al.*, 2014).

#### 4. Biofilms en industrie agroalimentaire

Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs de produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms (Srey *et al.*, 2013). Ces derniers causent des pertes économiques dues à la détérioration des aliments et des équipements, la perte de la qualité organoleptique et sanitaire des produits alimentaires finaux ainsi que la diminution de leur durée de conservation, ils affectent le processus chimique impliqué dans la production (Simoes *et al.*, 2010 ; Dzianch *et al.*, 2019). Ils peuvent aussi induire la corrosion des surfaces métalliques alimentaires et réduire l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermique (Chemielewski et Frand, 2003; Simoes *et al.*, 2010).

Ces biofilms sont classés en deux catégories, biofilms de procédés qui se forment par contact directe des produits et biofilms environnementaux qui se forment dans le milieu environnant (murs, plafonds) lors de la transformation des aliments (Teh *et al.*, 2015).

### 5. Stratégies de lutte contre les biofilms en industrie alimentaire

Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation de biofilm (Richards *et al.*, 2009; Landini *et al.*, 2010), celles-ci peuvent limiter l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne, empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien la dégrader (Richards *et al.*, 2009; Landini *et al.*, 2010; Tremblay *et al.*, 2014).

Dans la plupart des procédés industriels alimentaires, les surfaces de contact avec les aliments sont nettoyées et désinfectées quotidiennement. Pour les circuits fermés, un nettoyage acido-alcalin, le système CIP (clean in place) est utilisé (Bremer, 2006).

Après une procédure CIP les microorganismes peuvent rester sur les surfaces visiblement propres, l'usage des désinfectants en complément du CIP est recommandé, il est considéré comme nécessaire pour tuer et éliminer les résidus et cellules microbiennes qui restent attachées aux surfaces (Burgess *et al.*, 2010).

Une procédure du nettoyage est indispensable au préalable afin de casser et dissoudre l'EPS de la matrice du biofilm pour que les agents désinfectants puissent accéder aux cellules bactériennes viables (Chmielewski et Frank, 2003). Les enzymes peuvent être incorporées dans les solutions de nettoyage utilisées dans le système CIP (Lequette *et al.*, 2010) ainsi que la combinaison de différents agents alcalins ont amélioré l'efficacité du nettoyage dans l'élimination du biofilm (Antoniou et Frank, 2011).

L'activité antimicrobienne et antiadhésive des biosurfactants a attiré l'attention comme nouvel outil pour empêcher et perturber les biofilms formés dans les surfaces de contact alimentaire (Nitschke et Costa, 2007).

Le pré-conditionnement de la surface avec un agent tensioactif à également été rapporté pour empêcher l'adhérence bactérienne (Choi *et al.*, 2011). L'étude de Zeraik et Nitschki, faite en 2010, montre qu'après le conditionnement avec un agent tension actif, la surface devient plus hydrophile, ce qui induit une diminution de l'adhésion des bactéries.

L'incorporation des produits antimicrobiens dans les matériaux extérieurs (Park *et al.*, 2004), ou la modification des propriétés physico-chimiques de surfaces (Rosmanonho *et al.*, 2007) est également une voie de progrès pour éviter la formation de biofilm.

## 6. Nettoyage et désinfection en industrie alimentaire

### 6.1. Nettoyage

Le nettoyage a pour but d'éliminer toute trace de salissure présente sur les équipements et matériaux en contact avec l'aliment, l'efficacité du nettoyage est conditionnée par l'action chimique, l'action mécanique, la température et le temps de contact (Wirtanen et Salo, 2003)

Le nettoyage consiste à l'élimination des contaminants aux moyens de détergents (agents dont le mode d'action est physique ou physico-chimique) ces détergents sont classés en catégories (Herry *et al.*, 2003) :

#### Détergents alcalins

Leur rôle est d'enlever la croute organique collée par les traitements de chaleur, de saponifier les lipides saponifiables, de dissoudre la matière grasse, dégrader les protéines en acides aminés et de les ioniser puis les solubiliser (Didouh, 2015). On peut citer la soude, potasse, carbonat, phosphate trisodique...etc (Hery *et al.*, 2003).

L'alcalinité favorise la formation de tartre, source de corrosion des matériaux, d'où la nécessité de l'ajout d'antitartre (khamisse, 2012).

#### Détergents acides

Ont pour but de dissoudre les résidus minéraux résultant des aliments, de l'eau ou des réactions chimiques eau + aliment ou eau + aliment + produit de lavage alcalin (Didouh, 2015).

Les molécules actives les plus utilisées sont acide phosphorique, acide nitrique, acide lactique, acide acétique ...etc (Hery *et al.*, 2003).

Le choix de détergents doit tenir compte des souillures rencontrées dans l'industrie (Tableau 03).

**Tableau 3** : choix de détergent en fonction de types de souillures (Khamisse, 2012).

Types de souillures	Détergent
Souillures organique fraîche	Alcalin moyen, alcalin chloré
Souillures organique sèche	Alcalin fort
Souillures minérales	Acide

### Détergents enzymatiques

Sont constitués d'une ou de plusieurs enzymes, leur utilisation peut être judicieuse pour surmonter le problème des biofilms dans l'industrie alimentaire. La matrice d'EPS étant hétérogène, un mélange d'enzymes peut être nécessaire pour sa dégradation. Les mélanges peuvent être composés d'enzymes telles que les protéases (pour la dégradation des protéines), les lipases (pour la dégradation des lipides) ou les amylases (pour la dégradation de l'amidon) (Kirk *et al.*, 2002; Simoes *et al.*, 2010).

### 6.2. Désinfection

C'est l'utilisation des produits antimicrobiens pour inactiver et détruire les microorganismes présents sur un objet ou une surface. Cette opération réduit les cellules viables laissées après le nettoyage et empêche la croissance microbienne sur les surfaces. En absence de matière organique (graisses ou sucres), les désinfectants sont plus efficaces. L'efficacité est également influencée par la concentration, le temps de contact de produit, le pH et la température (Cloette *et al.*, 1998; Kuda, 2008).

En industrie alimentaire, la désinfection a pour but de réduire le nombre de microorganismes afin qu'ils ne puissent pas affecter la qualité et la sûreté des produits alimentaires (Vloková *et al.*, 2008). Il existe différentes classes de désinfectants en fonction de leurs principes actifs, parmi lesquelles: halogènes et dérivés, aldéhydes, alcools, oxydants, dérivé phénoliques, ammoniums quaternaires (Massicotte, 2009).

Le mode d'action des principaux désinfectants est résumé dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 4** : mode d'action des principaux désinfectants (Didouh, 2015).

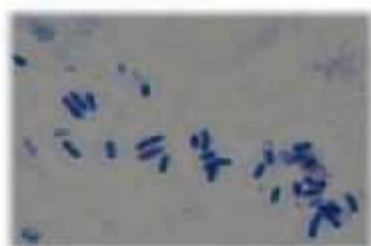
Classes	Cibles et mode d'action
Alcools	Dénaturation des protéines cytoplasmique et membranaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.
Aldéhydes	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.
Ammoniums quaternaires	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
Biguanides	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol
Halogènes chlorés et iodés	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)
Oxydants	Production de radicaux libres qui interagissent avec les macromolécules

## Chapitre III : Bactéries lactiques

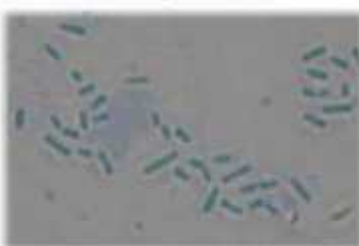
### 1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont définies comme des micro-organismes non sporifères, anaérobies facultatifs à Gram Positif qui se présentent sous forme de cocci ou de bâtonnets (figure 05) (Dordevi *et al.*, 2020), ce sont des chimioorganotrophes, leurs énergie nécessaire est puisée à partir des composés chimiques (Novik *et al.*, 2017).

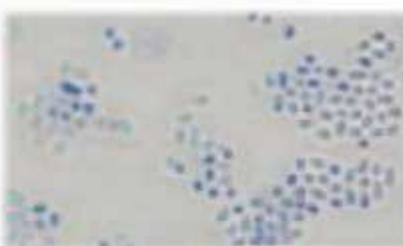
**A** *Weissellacibario*



**B** *Lactobacillus plantarum*



**C** *Leuconostocmesenteroide*



**Figure 05 :** bactérie lactique sous forme de bacilles arrondées (A), de bacilles (B) ou de coques (C), colorée au bleu de méthylène (Amandine, 2017).

Elles forment un groupe de bactéries très ubiquistes qui ont pour habitat de nombreux milieux naturels, on les rencontre dans les produits laitiers, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales, dans le tractus intestinal, le sol et dans l'eau (Novik *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2019; Dordevi *et al.*, 2020).

Elles constituent un groupe bactérien vaste et hétérogène qui sont connus par leurs capacités à produire de l'acide lactique comme principal produit final par des voies métaboliques particulières appelées fermentations lactiques, dont on distingue deux principales voies, la voie homofermentaire dans laquelle l'acide lactique est le principal et le seul produit du métabolisme, la seconde voie est la voie hétérofermentaire, quant à elle, en plus de l'acide lactique conduit à la production d'éthanol, d'acide acétique, de CO<sub>2</sub>... (Drouault et Corthier, 2001 ; Carré-Malouka, 2018 ; Dordevi *et al.*, 2020).

Les bactéries lactiques par leurs caractères variés et leurs multiples propriétés sont largement exploitées dans l'industrie agroalimentaire (Lairini *et al.*, 2014), elles revêtent une importance fondamentale dans l'alimentation humaine et animales (Holzapfelet Wood, 2014; Carré-Malouka 2018).

Elles occupent une place importante dans l'industrie en assurant une bonne sécurité alimentaire grâce à la production d'acide organique, elles assurent aussi des caractéristiques particulières d'arômes, de texture et de saveurs (Bekouche et Boulahrouf, 2005; Ennadir *et al.*, 2014), et elles sont utilisées dans plusieurs technologies en répondant aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Bouzaid *et al.*, 2016).

### 2. Classification

La première classification des bactéries lactiques est basée sur des caractéristiques phénotypiques et biochimiques telles que la morphologie cellulaire, mode de fermentation de glucose, croissance à différentes températures, la capacité à croître à des concentrations élevées en sel, composition en acides gras, la motilité ainsi que la tolérance aux acides ou aux alcalins. Le groupe de bactéries lactiques est classé comme suit :

Phylum des Firmicutes,

Classe des Bacilli,

L'ordre des Lactobacillales,

l'ordre des Lactobacillales est constitué de 12 genres principaux dont *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissala*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Rattanchaikunsopon et Phunkhachorn, 2010 ; Khalid, 2011 ; Quinto *et al.*, 2014 ; Mokoena , 2017 ; Carré-Malouka, 2018).

**Tableau 5** : Taxonomie et les clés de différenciation des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001).

Genre	Forme	Catalase	Réduction nitrate	Fermentation	Genre types
<i>Betabacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bacille	-	-	Homo et Hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Cornobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Coque	-	-	Homofermentaire	<i>Streptococcus</i>
					<i>Enterococcus</i>
					<i>Lactococcus</i>
					<i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Coque	-	-	Homofermentaire	<i>Leuconostoc</i>
					<i>Oenococcus</i>
					<i>Weissell</i>
<i>Micobacterium</i>	Bacille	+	+	Homofermentaire	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Coque	+	+	Homofermentaire	<i>Pedicoccus</i>
					<i>Tetragenococcus</i>

### 3. Bienfaits

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, présentant une grande variété d'effets bénéfiques sur la santé humaine et animale (Drouault et Corthier, 2001 ; Novik *et al.*, 2017). Elles interviennent dans l'amélioration de la digestion et l'assimilation des nutriments comme l'amélioration de la digestion du lactose, dans la prévention et le traitement des diarrhées ou des infections virales, la réduction du cholestérol dans le sang, la stimulation et le renforcement du système immunitaire, elles ont également un effet sur le cancer du côlon (Drouault et Corthier, 2001; Papadimitriou *et al.*, 2016; Novik *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2018).

### 4. Application et rôles

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble de micro-organismes diversifiés et extrêmement importants dans les industries alimentaires, et qui trouvent une large utilisation dans divers domaines (Novik *et al.*, 2017).

Elles sont impliquées dans la production d'exopolysaccharides qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité des produits finaux et les caractéristiques sensorielles ainsi que l'augmentation de l'homogénéité (Mozzi *et al.*, 2015; Hatti-Kaul *et al.*, 2018), la production de bactériocines qui ont une action inhibitrice contre les germes indésirables susceptibles de dégrader les produits alimentaires, la production d'arômes qui contribuent aux qualités organoleptiques.

Elles ont un rôle dans la conservation par la production d'une variété d'acides organiques principalement l'acide lactique et l'acide acétique responsable de la diminution du pH créant ainsi un environnement impropre aux germes pathogènes et d'altération. Elles sont appliquées aussi en tant que source de probiotiques, de vitamines et d'enzymes et comme culture de démarrage (Drouault et Corthier, 2001; Mozzi *et al.*, 2015).

### 5. Activités antimicrobienne

Les bactéries lactiques sont douées de nombreuses activités antimicrobiennes (Ammor *et al.*, 2006 ; Mobolaji et Wuraola, 2011). Elles peuvent inhiber la croissance des bactéries pathogènes dans les produits alimentaires principalement par la synthèse de divers composés antimicrobiens tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, diacétyle, reutéline et les bactériocines (Ammor *et al.*, 2006 ).

### 5.1. Acide lactique

Est le principal acide organique de la fermentation des bactéries lactiques (Ammor *et al.*, 2006) qui exerce un effet antimicrobien en réduisant le pH intracellulaire et l'inhibition d'une variété de fonction métabolique (Rattanchaikunsopon et Phunkhachorn, 2010; Dittoe *et al.*, 2018). L'action antibactérienne de l'acide est probablement attribuée à sa capacité sous forme non dissociée à pénétrer dans membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une réduction du pH intracellulaire et une perturbation de la force motrice transmembranaire du proton par libération des ions H<sup>+</sup> qui acidifient le cytoplasme (Reise *et al.*, 2012). Il est toxique pour de nombreuses bactéries, champignons et levures (Yang, 2000).

### 5.2. Diacétyle

C'est un composé qui est peut-être synthétisé par les fermentations homolactiques ou hétérolactiques, il a une action inhibitrice contre les bactéries Gram négatif (Yang, 2000 ; Ammor *et al.*, 2006).

### 5.3. Peroxyde d'hydrogène

Provoque la dénaturation d'une variété d'enzymes, l'augmentation de la perméabilité des membranes par la peroxydation des lipides membranaires, la production de bactéricide, des radicaux tels que le superoxyde et l'hydroxyle qui peuvent endommager l'ADN (Yang, 2000 ; Ammor *et al.*, 2006; Sunil et Narayana, 2008), il est largement exploité dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et des produits dentaires, textiles ainsi que la protection de l'environnement (Abbas *et al.*, 2010).

### 5.4. Reutérine

Composé antimicrobien dérivé du glycérol, il est produit dans des conditions anaérobies et en présence de glycérol, intervient dans la prévention de la formation de mycotoxines dans les aliments fermentés (Nes *et al.*, 2012).

### 5.5. Bactériocines

Peptides antimicrobiens exerçant des effets contre les espèces de façon taxonomique liées aux souches productrices (Soomro *et al.*, 2002; Zacharo et Lovih, 2012; Yan *et al.*, 2013). Elles sont thermostables, synthétisées par voie ribosomique douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre les espèces proches (spectre étroit) ou d'autre genres (spectre large) (Cotter *et al.*, 2005). Elles sont utilisées comme bioconservateurs car sont

inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes, tolérantes aux variations de pH et possèdent un spectre d'activité relativement large (Galvez *et al.*, 2007; Thakar et Roy, 2009).

### 6. Activité antibiofilm

En raison des multiples problèmes liés aux biofilms, les chercheurs ont recours à l'utilisation des métabolites secondaires des bactéries lactiques afin de limiter la croissance et l'émergence des biofilms.

Des études récentes ont indiqué que certains produits de bactéries lactiques modifient la virulence en perturbant les voies de signalisation et de la détection de quorum des pathogènes (Kiymaci *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018).

### 7. Condition de culture

Les bactéries lactiques sont exigeantes et nécessitent des milieux de culture qui se caractérisent par une composition complexe et riche en nombreux nutriments (Carré-Malouka, 2018). Ces bactéries ne peuvent pas pousser sur des milieux minéraux additionnés seulement d'une source de carbone. En plus des glucides (dextrose, saccharose ou lactose), le milieu doit contenir diverses sources d'azote (comme extrait de levures, extrait de bœuf, peptone), des solutions tampons à fin de maintenir le pH à des niveaux optimaux grâce à la production de l'acide pendant la croissance bactérienne (comme l'acétate de sodium, citrate trisodique et di-sodium-glycérophosphate), des minéraux principalement  $Mn^{2+}$  (responsable du balayage catalytique d' $O_2$  nécessaire à la croissance anaérobie) et  $Mg^{2+}$  (stimule la croissance et améliore la survie des bactéries lactiques). Le sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ ) et sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) sont également inclus dans la culture de ces bactéries. Des tensioactifs tels que la lécithine ou tweens peuvent également être utilisés à fin d'améliorer la croissance de la plus part des genres de ces bactéries, ainsi que l'utilisation des surfactants qui protègent les cellules des conditions difficiles et améliorent l'absorption des nutriments (Hayek *et al.*, 2019).

Les milieux de cultures standard couramment et largement utilisés pour servir à la croissance de la plupart des genres des bactéries lactiques sont le milieu MRS (de Man Rogosa, Sharpe) et le milieu M17 (Hayek *et al.*, 2019).

L'étude de Tabak et Bensoltane (2011), qui consiste à l'étude morphologique, physiologique et biochimique des souches lactique *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* montre que :

La souche *S.thermophilus* cultivée sur le milieu M17 solide donne des colonies rondes ou lenticulaires de couleur blanc crème, l'étude microscopique d'un frottis fixé et coloré à partir

des colonies précédentes montre que cette bactérie est sous forme de coques Gram positif (+) groupé en paire ou en chaînes.

La souche *L.bulgaricus*ensemencée sur le milieu MRS solide donne des petites colonies identiques de couleur blanc crème, l'observation microscopique de ces colonies révèle que cette bactérie est sous forme de bacilles Gram positif (+) groupé en paire ou en chaînes.

## Chapitre IV : champignons endophytes

### 1. Définition

Les champignons endophytes sont définis comme étant tout micro-organisme hétérotrophe résidant entièrement dans les tissus de l'hôte, et se développant dans les racines, tiges ou les feuilles sans provoquer des symptômes apparents à son hôte végétale, et qui émergent pour sporuler à la sénescence de la plante ou tissu de l'hôte (Tan et Zou, 2001 ; Arnold et Lutzoni, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2009).

### 2. Diversité

Les champignons endophytes sont omniprésents dans la nature (Arnold et Lutzoni, 2007), constituant un groupe considérablement diversifié dont la plupart appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (Saar *et al.*, 2001 ; Arnold et Lutzoni, 2007; Oses *et al.*, 2008).

La diversité des champignons endophytes dépend des conditions climatiques, édaphiques et de l'hétérogénéité des habitats et les niches occupées par leurs hôtes (Sieber, 2002). Elle dépend aussi de l'âge de la plante (Arnold *et al.*, 2003).

### 3. Classification

Les champignons endophytes peuvent être classés en deux groupes : les *clavicipitaceae* et les *non clavicipitaceae* et qui sont subdivisé en fonction de la gamme d'hôtes, de la colonisation, mode de transmission ainsi que les fonctions écologiques en quatre classes (Rodriguez *et al.*, 2009).

### 4. Importance et rôles

Les champignons endophytes sont reconnus comme une source importante de produits bioactifs naturels, ayant un potentiel d'application dans divers domaines y compris l'agriculture, la médecine et l'industrie alimentaire (Strobel *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2009; Beatriz et Taidés, 2017).

Ils présentent de bonnes répercussions sur les communautés végétales, ils confèrent des avantages aux plantes hôtes y compris la tolérance aux herbicides, à la sécheresse, aux métaux lourds, la protection contre les maladies et contre les insectes ravageurs (Arnold *et al.*, 2003; Bayet *et al.*, 2009), ils favorisent aussi la croissance des plantes hôtes (Berge et hallmann, 2006). Ils produisent les mêmes substances ou des substances similaires à celles

provenant de la plante hôte (Zhou *et al.*, 2009) et libèrent des métabolites qui activent le mécanisme de défense de l'hôte contre d'autres organismes pathogènes (Strobel et Daisy, 2003), ils sont souvent une source d'antibiotiques, d'antifongiques (Strobel, 2002), d'antiviraux et d'anticancéreuse (Strobel et Daisy, 2003).

Ils ont un intérêt biotechnologique élevé dans le traitement des aliments, la fabrication de détergents, textiles, produits pharmaceutiques, traitement médical et en biologie moléculaire (Ma *et al.*, 2005).

### **5. Métabolites secondaires**

Les champignons endophytes produisant des métabolites secondaires, des composés qui ne sont pas nécessaires aux processus cellulaires de base, mais qui sont considérés comme essentiels aux fonctions écologiques (Spatafora et Bushley, 2015). Ces champignons produisent le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganisme (Zhang *et al.*, 2010), ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes, peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinone, composés aliphatiques, flavonoïdes... (Yu *et al.*, 2010).

Les métabolites secondaires produits par les endophytes permettent l'amélioration des conditions physiques telles qu'une résistance accrue aux herbivores, le parasitisme, la sécheresse, ainsi que l'amélioration de la croissance (Firakova *et al.*, 2007).

Ils empêchant la croissance ou l'activité de l'agent phytopathogène ce qui inhiberait un certain nombre de microorganismes (Yu *et al.*, 2010), grâce à la synthèse des composés ayant des propriétés antibiotiques ; antifongiques; antiviraux; antibiofilms; immunosuppresseurs; agents anticancéreux; antioxydants; insecticides et autres substances biologiquement actives.

### **6. Activité antibiofilm**

Près de 80% de la biomasse bactérienne sous forme de biofilm conduit à un effet multi-résistant aux antibiotiques et aux biocides, face à ce phénomène de l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules antibactériennes est devenue une nécessité absolue. Les métabolites secondaires des champignons endophytes peuvent être de nouveaux alternatifs naturels pour lutter contre la formation des biofilms (Rajivgandhi *et al.*, 2018).

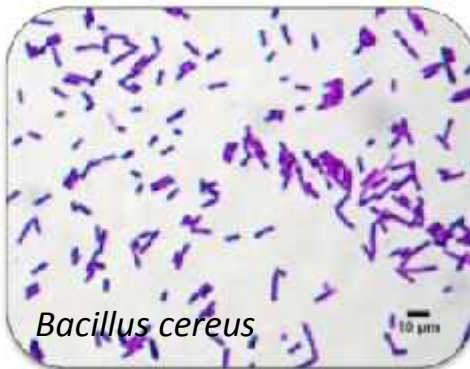
Les flavonoïdes tels que l'apigénine, la lutéoline, la naringénine, la rutine, la sinensétine et la quercétine sont des métabolites secondaires importants, affectants la fonction barrière de la membrane en augmentant la perméabilité de la membrane aux ions et provoquent une

altération de l'état bioénergétique de la cellule bactériens (Mirzoeva *et al.*, 1997). Ils agissent aussi en inhibant la signalisation cellule-cellule et la formation de biofilm (Virkam *et al.*, 2010).

Une étude récente de Rajivgandhi et ces collaborateurs (2018), montre que l'extrait d'acétate d'éthyl des Actinomycètes endophyte de la plante de mangrove *Rhizophora mucronata* possède une puissante activité antibiofilm contre certains uropathogènes. Il a un effet en endommageant la membrane cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

## **Matériel et méthodes**

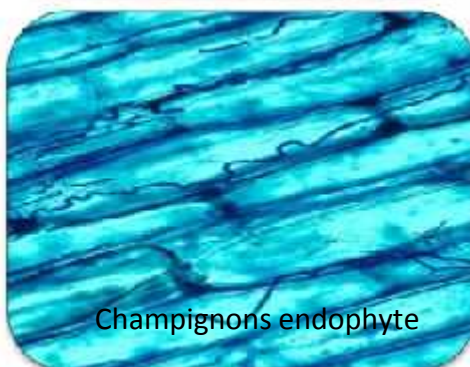
## Méthodes



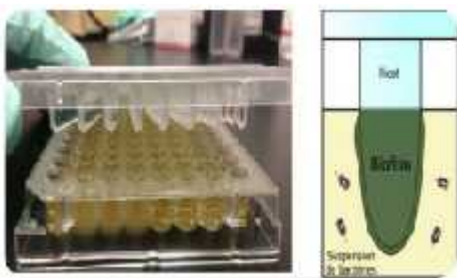
- Isolement de *Bacillus cereus* dans le lait de vache cru.
- Identification de *Bacillus cereus*.
- Evaluer sa capacité de former un biofilm.



- Isolement des bactéries lactique.
- Extraction des métabolites secondaires des bactéries lactiques.



- Isolement des champignons endophytes.
- Extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes.



Tester les molécules sur le biofilm de *Bacillus cereus* formé sur la microplaque



# **Conclusion**

A la lumière de cette étude il apparaît que le lait de vache cru est sujet à la contamination par des bactéries *Bacillus cereus* ainsi que leur biofilm.

D'après la présente étude, les bactéries lactiques et les champignons endophytes présentent une source puissante de nouveaux produits naturels pour la lutte contre différents germes pathogènes y compris *Bacillus cereus*.

Suite aux conditions sanitaires (COVID-19) la partie pratique n'a pas été réalisé.



## **Références bibliographiques**

- 1- **Abbas M.E., Luo W., Zhu L., Zou, J & Tang H.(2010)**. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. *Food Chemistry*. 120 :327-331.
- 2- **Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani L., Isobe M. (1994)**. A novel dodecadepsipeptide cereulide, isolated from *Bacillus cereus* vacuole formation in Hep 2 cells. *FEMS microbiology letters*. 121 (1): 31-34.
- 3- **Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. (1995)**. A novel dodecadepsipeptide cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*. 129 (1) : 17-19.
- 4- **Amandine F. (2017)**. Recherche des bactéries lactiques autochtones capable de mener la fermentation des fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Thèse en vue d'obtention de doctorat de l'université de la réunion. 192 pages.
- 5- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006)**. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food control*. 17 : 454-468.
- 6- **Anamika., Samikasha J., Manila S., Sharda S & Prakash A.(2018)**. Fungal endophytes and their secondary metabolites: Role in sustainable agriculture. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 121-146.
- 7- **Anand S., Singh D., Avadhanula M., Marka S. (2014)**. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. *Comprehensive review in food science and food safety*. 13 : 18-33.
- 8- **Anses. (2011)**. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Bacillus cereus*, [https:// www.anses.fr](https://www.anses.fr).
- 9- **Antoniou A & Frank J.F. (2005)**. Removal of *Pseudomonas putida* associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. *Journal of food protection*. 68 (2) : 277-281.
- 10- **Antoine Y.B. (2016)**. Contamination du lait cru et de l'attiéké vendus sur les marchés informels à Abidjan (Côte d'Ivoire) par les groupes *Bacillus cereus* et analyse de risques. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université Nangui Abrogua. 358p.
- 11- **Arnold A.E & Lutzoni F. (2007)**. Diversity and host range of foliar fungal endophytes : are tropical leaves biodiversity host ? *Ecology*. 88 :541-549.
- 12- **Arnold A.E., Mejia L.C., Kylo F., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N & Herre E.A. (2003)**. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(26) :15649-15654.

- 13- Auger M. (2012).** Formation des biofilms in vitro par des souches cliniques de *Escherichia coli* (impact de la modification des conditions expérimentales). Thèse en vue d'obtention du doctorat de l'université de Nantes.90 pages.
- 14- Bayat F., Mirlohi A & Khodmabashik M.(2009).** Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanism of tall fescue in a hydroponics culture. Russian Journal of Plant Physiology. 56(4) :510-516.
- 15- Bayomi M.A., Kamal R.M., And El Aal S.F & Awad E.I. (2012).** Assessment of regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of food-borne pathogens and their biofilms. International Journal of Food Microbiology. 158 : 225-231.
- 16- Beatriz D.S.S & Taidés T.D.S.(2017).** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of jacaranda decurrens schum (Carbinha-do-canpo). Brazilian Archives of Biology and Technology. 49 :353-359.
- 17- Bekhouche F & Boulahrouf A.(2005).** Étude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. Sciences & technologie. Université Mentouri Constantine. (23) :38-45.
- 18- Beuvier E & Feutry F. (2005).** Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Publication de INRA-unité de recherche en technologie et analyses laitières. 156 : 1- 6.
- 19- Bonfoh B., Ankers P., Sall A., Diabat E.M., Tembely S., Farah Z., Alfaroukh I.O., Zinsstag J. (2005).** Schéma fonctionnel de service aux petits producteurs laitiers périurbains de Bamako (Mali). Revue étude recherche. 12 : 7-25
- 20- Bouzaid M., Chatoui R., L'attache H & Hasbi A.(2016).** Activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc). Revue de Microbiologie industriel, sanitaire et environnemental.10(1) :1-12.
- 21- Bremer P.J., Fillery S., Mcquillan A.J. (2006).** Laboratory scale clean in place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilm. International journal of food microbiology. 106 (3): 254-262.
- 22- Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., De Buyser M. L., Collette C., Garin-Bastuji B., Thorel M.F. (1997).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Review of science technology office international epizooties. 16 (2): 452-471.
- 23- Burgess S.A., Lindsay D., Flint S.H. (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International journal of food microbiology. 144 (2) : 215-225.

- 24- Carré-Mlouka A. (2018).** Bactéries lactiques et métabolisme fermentaire. Muséum national d'Histoire naturelle-DIREF.
- 25- Chmielewski R.A.N & Frank J.F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensives review in food science and food safety*. 2 : 23-32.
- 26- Choi N.C., Park S.J., Lee C.G., Park J.A., Kim S.B. (2011).** Influence of surfactans on bacterial adhesion to metal oxyde- coated surfaces. *Environnemental engineering research*. 16 (4): 219-225.
- 27- Cloette T.E., Jacobs L., Brozel V.S. (1998).** Chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*. 9 (1): 23-37.
- 28- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005).** Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature review microbiology*. 3: 777-788.
- 29- Colombo M., Castilho N.P.A., Todrov S.D & Augusto Nero L. (2018).** Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology*.18 (219): 1-12.
- 30- Davies D. G., parsek M.R., pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*.280 : 295-298.
- 31-Didouh N. (2015).** Caractérisation de spore de *Bacillus cereus* isolés d'équipement laitiers, capacité de formation et de résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Thèse en vue d'obtention du doctorat de l'université Aboubekr Belkaid Algérie. 99p.
- 32- Dittoe D.K., Ricke S.C & Kiess A.S. (2018).** Organic acids and potential for modifying the Avian gastro intestinal tract and reducing pathogens disease. *Frontiers in Vetrenary Science* 5(216):1-12.
- 33- Dromigny E. (2007).** *Bacillus cereus*. Monographie de Microbiologie. Éditions médicales Internationales. Éditions TEC & DOC Lavoisier.379p.
- 34- Droualt S & Gérard C. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérer avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary research*. 32 : 101-117.
- 35- Dzianach P.A., Dyks G.A., Strachan N.J.C., Forbes K.J & Pérez-Reche F.J. (2019).** Challenges of biofilms control and utilization: lessons from mathematical modelling. *Journal of royal society interface*. 16.
- 36- Ennadir J., Hassikou R., Al Askari G., Arhou M., Bouazza F., Allah L., Amine S.A & Khedid K. (2014).** Phénotypique and génotypique characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco. *Journal of materials and Environnemental Science*. 5(4):1125-1131.

- 37- FAO. (1995).** Food and agriculture organisation, le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO alimentation et nutrition n°28.
- Farougou S., Kpodékon T.M., Philippe., Issaka Y., Cyrille B., boniface Y & Dominique S. (2011).** Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée En milieu extensif au Bénin31. Actes de 3 ème colloque des sciences, Cultures et Technologies. 1-15.
- 38- Firakova S., Sturdikova M., Muckova M. (2007).** Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia.* 62(3) : 251-257.
- 39- Foutou K., Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Avgeris I., Bezirtzoglou E., Akrida-Demertzi K. (2011).** Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. Elsevier. 17 : 315-319.
- 40- Fritze, D. (2004).** Taxonomy of the genus bacillus and related genera: The aerobic endospore forming bacteria. *Phytopathology.* 94(11) : 1245–1248.
- 41- Gallery R. E., Dalling J. W & Arnold A. E. (2007).** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology.* 88: 582-588.
- 42- Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Ben Omar N. (2007).** bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology.*120 : 51-70.
- 43- Goetz G., Dufour S., Archambault M., Malouin F. (2016).** Importance et control de biofilms formés par les Staphylocoques loes d'une infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. *Revue de médecine vétérinaire.* 167 : 215-229.
- 44- Granum P. E., Brynestad S. , Kramer J.M. (1993).** Analysis of enterotoxine production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *International journal food microbiology.* 17 (4) : 269-79.
- 45- Gregory T. (2008).** Detection par PCR en temps réel du groupe *Bacillus cereus* et identification de *Bacillus Anthracis* dans les produits alimentaires. Université de Sherbrooke. 139 p.
- 46- Guérin A. (2016).** Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans les aliments prêts à l'emploi- impact des conditions physico-chimique. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'école doctorale GAIA.202 p.
- 47- Hatti- Kaul R., Chen L., Dishisha T & El Enshay H. (2018).** Lactic acid bacteria : from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters.* 365(20). 1-14.
- 48- Hayek S.A., Gyawali R., Aljaloud S.D., Krastanov A., Salam A.I. (2019).** Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of dairy research.*86 (4): 490-502.

- 49- Herry M., Binet S., Gagnaire F., Gerardin F., Hecht G., Massin N. (2003).** Nettoyage et désinfection dans l'industrie agroalimentaire : évaluation des expositions aux polluants chimiques. Institut national de la recherche scientifique. 95 : 333-350.
- 50- Higgins K.L., Arnold A.E., Miadlikowska J., Savage S.D., Lutzoni F. (2007).** Phylogenetic relations, host affinity and geographic structure of boreal and arctic endophytes from the major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and evolution*. 42 : 543-555.
- 51- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American journal of clinical nutrition*. 73 : 365-373.
- 52- Holzappel W.H. & Wood B.J.B. (2014).** Lactic acid bacteria : biodiversity and taxonomy. 632 p.
- 53- Jalgaonwala R.E., Mohite B.V., Mahajan R.T. (2011).** Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal microbiology biotechnology research*. 1 (2) : 21-32.
- 54- Khalid K. (2011).** An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1(3) : 1-13.
- 55- Khamisse E. (2012).** Etude de microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. Thèse en vue d'obtention du doctorat de l'institut des sciences et industrie du vivant et de l'environnement. 183 p.
- 56- Kimyemie M. E., Altanal N., Gumustas M., Ozkan S.A. & Akin A. (2018).** Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbiology and pathology*. 121 : 190-197.
- 57- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C C. (2002).** Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*. 13 (4): 345-351.
- 58- Kuda T., Yano T., Kuda M.T. (2008).** Resistance to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *Food and science technology*. 41 : 988-993.
- 59- Laithier C. (2011).** Ouvrage collectif cordonné "microflore du lait cru". Réseau fromage de terroirs, conseil national des appellations d'origine laitière. 131p.
- 60- Lairini S., Beqqali N., Bouslanti R., Belkhou R & Zerrouq F., (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du kéfir. *Afrique Science*. 10(4) : 267-277
- 61- Landini P., Antoniani D., Burgess J.G., Nijland R. (2010).** Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied microbiology biotechnology*. 86 (3) : 813-823.

- 62- Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E., Frisvad J.C. (2005).** Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbiol drug discovery. *Natural product reports*. 22 (6): 672-695.
- 63- Lequette Y., Boels G., Clarisse M., Faille C. (2010).** Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolated in the food industry. *Biofouling*. 26 (6) : 421-431.
- 64- Lunardelli P., Oliveira S., Aparecida D., Honorata J.H.L., Ikegak M. (2016).** Importance and implication of the production of phenolic secondry metabolites by endophytic fungi. *Medicinal chemistry*. 16 (4): 259-271.
- 65- Ma Y.M., Li Y., Liu J.Y., Song Y.C., Tan R. (2004).** Anti *Helicobacter pylori* metabolite from *Rhizoctonia sp* CY064 AN endophytic fungus in *Cynodondactylon*. *Fitoterapia*. 75 (5) : 451-456.
- 66- Malek F. (2019).** Bactérie sporulé et biofilm : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaé pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*. 65 : 1-16.
- 67- Mami A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrice de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqué dans les toxi-infection alimentaire en Algérie. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université d'Oran. 164 p.
- 68-Mansour M. (2015).** Étude de l'influence des pratiques d'élevage sur la qualité du lait : effet d'alimentation. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université Ferhat Abbas Sétif 1. 190p.
- 69- Massicotte R. (2009).** Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité : principes fondamentaux. Edition la direction des communications du ministère de la santé et des services sociaux du Québec.
- 70- Menad N. (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactique isolées à partir du lait de vache vis-à-vis des *Salmonella sp*. Thèse en vue d'obtention de doctorat en microbiologie à l'université de Mostaganem. 196 p.
- 71- Merzougui S., Lkhider M & Cohen N. (2013).** *Bacillus cereus*, a real problem for food industry ? . *Science lib Editions Mersenne*. 5(130915) : 2111-4706.
- 72- Messelhäusser U., Fricker M., Ehling-Schulz M., Zeigler H., Elmer-Englhard D., Kleih W & Busch U. (2007).** Real-time-PCR-system zum Nachweis von *Bacillus cereus* (emetischerTyp) in Leben smitteln. *Journal für verbraucherschutz und Leben smitteln*. 2 :190-193.
- 73- Mirzoeva O., Grishani R., Calder P. (1997).** Antimicrobial action of propolis and some of its components : the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology research*. 152 : 239-246.

- 74- Mobolaji O.A & Wuraola F.O. (2011).** Assesment of the antimicrobial activity of lactic acid Bacteria isolated from two fermented maize products-ogi and kunni-zaki. *Malaysian Journal ofMicrobiology*.7(3) :124-128.
- 75- Mokoena M.P. (2017).** Lactic acid bacteria and their bactériocines : Classification, biosynthesis and application against urpathogens. A Mini-Review. *Molecules*. 22(1255) :1-13.
- 76- Mozzi F., Raya R.R & Vignolo G.M.(2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria. Nouvel application. Blackwellpublishing. 414.
- 77- Nes I.F., Kjos M & Diep DB. (2012).** Antimicrobial Components of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*CRC Press. 285-311.
- 78- Nitschke M & Costa S.G.V.A.O. (2007).** Biosurfactants in food industry.*Food science and technology*. 18 (5): 252-259.
- 79- Novik G., Merrovskaya O & Savich V. (2017).** Wastedegradation and utilization by lactic acid bacteria : use of lactic acid bacteria in production of food additives, bioenergyand biogas. *Food additives*. 106-146.
- 80- Oses R., Valenzuela S., Créer Je., Sa Fuentes E & Rodriguez J. (2008).** Fungal Endophytes in xylem of healthy chileantrees and thier possible role in early wood decay. *Fungal diversity*. 33 :77-86.
- 81- Papadimitriou K., Alegria A., Bron P.A., De Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J.A., Linares D.H., Ross P., Stanton C., TurroneF., Sinderen D.V., Varmanen P., Ventura M., Zuniga M., Tsakalidou E & Kok J. (2016).** Stress Physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.80 :837-890.
- 82- Park A.I., Daeschel M.A., Zhao Y. (2004).** Functional properties of antimicrobial lysozyme- chitosan composite film. *Journal of food science*. 69 (8) : 215-221.
- 83- Pougheon S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse en vue d'obtention de grade du docteur vétérinaire de l'école nationale vétérinaire de Toulouse. 102 pages.
- 84- Quinto E. J., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Gurbes T. (2014).** Bactéries probiotiques d'acide lactique, un examen. *Food and nutrition science*. 5 (18) : 1765-1775.
- 85- Racha M., Faille C., Kallassy M., Gohar M. (2016).** Bacillus cereus Biofilms same, only different. *Frontiers in microbiology* 7 : 1-16.
- 86- Rahli F. (2015).** Valorisation de lait de chamelle par exploitation des potentialités technologies des bactéries lactiques isolées localement. Thèse en vue d'obtention de doctorat en contrôle microbiologique à l'université d'Oran.165p.

- 87- Rajivgandhi G., Senthil R., Ramachandran G., Maruthupandy M., Manoharan N. (2018).** Antibiofilm activity of marine endophytic actinomycetes compound isolated from mangrove plant *Rhizophora mucronata*, muthupet mangrove region, tamilnadu, India. *Journal of terrestrial and marine research.* 2(4) : 1-7.
- 88- Rattanachaikunson P & Phumkhachon P. (2010).** Lactic acid bacteria :their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biology Research.* 1(4) : 422-426.
- 89- Reis J.s., Paula A.T., Casarotti S.N & Penna A.L.B. (2012).** Lactic acid bacteria Antimicrobial compounds : characteristic and application. *Food Engineering Reviews.* 4 :124- 140.
- 90- Richards J.J & Melander C. (2009).** Controlling bacterial biofilms. *ChemBiochem.*10 (14) : 2287-2294.
- 91- Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S. (2009).** Fungal Endophytes : diversity and functional roles. *New phytologist.*182 :314-330.
- 92- Rosmaninho R., Santos O., Nylander T., Paulsson M., Muller-Steinhagen H., Melo L. (2007).** Modified stainless steel surface targeted to reduce fouling-evaluation of fouling by milk components. *Journal of food engineering.* 80 (4) : 1176-1187.
- 93- Roux A & Ghigo J.M. (2006).** Bacterial biofilms (communications) Fiche technique. 261-267.
- 94- Ruiz Rodriguez L.G., Mohamed F., Belckwedel J., Medina R., De Vuyst L., Hebert E.M., Mozzi F. (2019).** Diversité et propriétés des bactéries lactiques isolées des fruits et fleurs sauvages présentes dans le nord de l'Argentine.10 (1091) : 1-26.
- 95- Saar D.E., Polans N.O., Sorensen P.D & Duvall M.R. (2001).** Angiosperme DNA contamination by endophytic fungi : Detection and methods of avoidance. *Plant molecular biology reporter.* 19 :249-260.
- 96- Saikkonen K., Faeth S., Helander M & Sullivan T.J. (1998).** Fungal endophytes : a continuum of interactions with host plants. *Annual review of ecology and systematic.*29 : 319-343.
- 97- Sieber T. N. (2002).** Fungal root endophytes. In: *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., Review and expanded. 887-917.
- 98- Simoes M., Simoes L.C., Vieira B. (2010).** A review of current and emergent biofilm strategies. *Food science and technologie* 43 : 573-583.

- 99- Song Y.C., Li H., Ye Y.H., Shan C.Y., Yang Y.M., Tan R.X. (2004).** Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW 1116 cell and some microbial growths. *FEMS microbiology letters*. 24 (1) : 67-72.
- 100- Soomro A.H., Masud T & Anwaar K. (2002).** Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(1) :20-24.
- 101- Spatafora J.W & Bushley K.E. (2015).** Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Current opinion in plant biology*. 26 : 37-44.
- 102- Srey S., Jahid I.K., Sang D.H. (2013).** Biofilm formation in food industries : a food safety concern. *Food control*. 3 (2) : 572-585.
- 103- Stenfors A.T., Fagerlund A., Granum E. (2008).** From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology review* 32 (4) : 479-606.
- 104- Strobel G & Daisy B. (2003).** Bioprospecting for Microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*. 67(4) : 491-502.
- 105- Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*. 67 (2) : 257-268.
- 106- Sunil, K & Narayana, B.(2008).** Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 81 :422-426
- 107- Tabak S & Bensoltane A. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales. *Nature technologie*. 6 : 71-79.
- 108- Tan R.X & Zhou W.X. (2001).** Endophyte : a rich source of functional metabolites. *National Product Reports*. 18 : 448-495.
- 109- Taybi N. , Arfaoui A. , Fadli M. (2014).** Evaluation of microbiological quality of raw milk in the region of Gharb, Morocco. *International journal of innovation and scientific research*. 9 (2) : 487-493.
- 110- Teh K.H., Flint S., Brooks J & Knight G. (2015).** Biofilms in the dairy industry. *Society of dairy technology*. 263p.
- 111- Téllez S.(2010).** Biofilms and their impact on food industry. *Centro De Vigilancia Sanitaria Veterinaria. Outreach Journal*.
- 112- Thakar R.L & Uptal R. (2009).** Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Research journal microbiology*. 4 (3) : 122-131.

- 113- Trautner B.W & Darouche R.O. (2004).** Catheter associated infection : pathogenest affects prevention. Archives of international medicine. 164 (8) : 842-850.
- 114- Tremblay D.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Bacterial biofilms : their importance in animal health and public health. The canadian journal of veterinary research 78 (2) : 100-116.
- 115- Valérie M., Agnès H & Jean-François.(2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : Diversité et influence des conditions de production. Institute national de la recherche agronomique. 81(5) :575-592.
- 116- Velázquez-Ordoñez V.,Valladares-Carranza B., Tenorio-Borroto E., Talavera-Rojas M.,Varela-GuerreroJ.A., Acosta-Dibarrat J., Puigvert F.,Grille L., RevelloA.G & Pareja L. (2019).** Microbial Contamination in Milk Quality and Health risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time. 1-25.
- 117- Verma V.C., Kharwar R.N &Strobel G.A. (2009).** Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. 4(11) :1511-1532.
- 118- Verran J. (2002).** Biofouling in food processing biofilm or biotransfer potential ?. Insituation of chemical engineers. 80 (4): 292-298.
- 119- Vignola C. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Edition press internationales polytechnique, canada. 600 p.
- 120- Vikram A., Jayaprakasha G.K., Jesudhasan P.R., Pillai S.D., Patil B.S. (2010).** Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. Journal of applied microbiology.109 : 515-527
- 121- Vlakova H., Barak V., Seydlova R., Pavlik I., Schlegelova J. (2008).** Biofilms and Hygiene on dairy farms and in the dairy industry : sanitation chemical products and their effectivens on biofilm- a review. Journal of food science.26 : 309-323.
- 122- Whitman W.B. (2009).** Berge's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition.3. 1450p.
- 123- Wirtanen G & Salo S. (2003).** Desinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. Reviews in environmental science and biotechnology. 2 (24): 293-306.
- 124- Yang, Z. (2000).** Antimicrobial compounds and extracellular polysaaharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, Department Food Technology University, University of Helsinki, 61 p.
- 125- Yiyng H., Stev H., Palmer J.S. (2020).** Bacillus cereus spores and toxins- the potentiel role of biofilms.Food microbiology. 90 : 1-7.

- 126- Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P., Qin L. (2010).** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological research*. 165 (6): 437-449.
- 127- Zalan Z., Nemeth R., Barath A &Halasz A. (2005).** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*. 43(3) : 219-225.
- 128- Zacharo, M.P & Lovitt R.W. (2012).** ‘Bacteriocins produced by lactic acid bacteria’ *APCBEEProcedia*. 2 :50-56.
- 129- Zeraik A.E & Nitschke M. (2010).** Biosurfactans as agents to reduce adhesion of pathogeni bacteria to polystyrene surfaces : effect of temperature and hydrophobicity. *Curr microbiology*. 61 (6) : 554-559.
- 130- Zhang H.W., Song Y.C., Tan R.X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*. 23(5) : 753-771.
- 131- Zhao X. & GanzleM.G. (2018).** Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiologie*.272 : 12-21.
- 132- Zottola A.E & Sasahara K.C. (1994).** Microbial biofilms in the food processing industry- should they be concern?. *International journal food microbiology*. 23 (2) : 125-148.



# **Annexes**

---

**Compositions des Milieux de culture****1. Milieu Mossel**

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	10g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	25mg
Sulfate de polymyxine B	105UI
Agar	14g
Eau distillée	900ml
pH final = $7.2 \pm 0.2$	

**2. Milieu MRS (de Man Rogosa, sharpe)**

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
Agar	10g
pH = $6.2 \pm 0.2$	

### 3. Milieu M17

Tryptone	2.5g
Peptone papainique de viande	5g
Peptone pepsique de viande	2.5g
Extrait de viande	5g
Extrait autolytique de levure	2.5g
Béta-Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0.25g
Acide ascorbique	0.5g
Agar	15g
pH = 7.1 ± 0.2	



## Résumé

Le lait représente un aliment précieux régulièrement consommé par les gens, il joue un rôle important dans la nutrition humaine. Cependant, le lait est très vulnérable à la contamination bactérienne, il peut être contaminé par des agents pathogènes provenant de vaches laitières ou de l'environnement de la ferme.

L'exploitation des interactions bactériennes et des champignons endophytes sont un nouveau moyen pour lutter contre les germes indésirables y compris *Bacillus cereus*.

L'objectif assigné à cette étude, est l'évaluation de la formation de biofilms dans le lait de vache cru par les bactéries du groupe *Bacillus cereus* et la recherche de molécule antibiofilms.

Après l'analyse de plusieurs articles, thèses et livres, le résultat montre que les bactéries lactiques ont plusieurs activités, à savoir activités antibiofilms, qui revient aux métabolites secondaires sécrétées par les bactéries lactiques, on peut citer le dioxyde d'hygiène, le diacétyle, les bactériocines, la reutérine ainsi que l'acide lactique qui joue un rôle d'inhibiteur bactérien par l'abaissement du pH intracellulaire.

Les champignons endophytes quant à eux sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaine.



## **Abstract**

Milk is a precious element of our diet regularly consumed by people, it plays an important role in the human nutrition. But it is vulnerable to bacterial contamination. Raw milk can be contaminated by pathogens coming from the milk cows or the environment of the farm.

The exploitation of the bacterial interactions and endophytic fungi is a new way to fight against unwanted germs including bacillus cereus.

The objectif assigned to this study, is the evaluation of the formation of biofilms in raw milk by bacteria from the group of Bacillus cereus and the search for antibiofilm molecules.

After analysis of many articles, theses and books, the result shows that lactic bacteria have various activities, among them antimicrobial and antibiofilm activities which are attributed to secondary metabolites secreted by lactic bacteria such as hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocins, reuterin and lactic acid that plays the role of a bacterial inhibitor by lowering the intracellular pH.

The endophytic fungi are excellent sources of new bioactive natural products which can be exploited in many fields