

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie
Option: Biotechnologie Microbienne

Etude bibliographique sur *Bacillus cereus* dans lait de chèvre: formation des biofilms et recherche des molécules anti-biofilms

Présenté par :

M^{elle} HAMDIDOUCHE Dyhia

M^{elle} SAID OUAMER Wissem

Devant le membre de jury :

M^{lle} BENAHMED DJILALI A.	Maitre de conférence A	U.M.M.T.O	Présidente
M^{me} AFIF CHAUCHE T.	Maitre de conférence B	U.M.M.T.O	Promotrice
M^{lle} DERMECHE S.	Maitre de conférence B	U.M.M.T.O	Examinatrice

Année universitaire: 2019/2020



Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout
puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et
la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère
promotrice*

*M^{me} : Affif Chaouch pour ses précieux conseils sa
confiance et son aide durant toute la période du travail.*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à
commencer*

*par: M^{lle} **BENAHMED DJILALI A.** Présidente de jury.*

*M^{lle} **Dermeche.** Examinatrice.*





Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mon cher père et à ma chère mère, Je n'ai jamais oublié votre soutien, patience, amour et encouragement. Je vous promets de donner le meilleur de moi-même pour que vous soyez toujours fiers de moi.

A ma sœur Tamazight.

A mon frère Yougourthen.

A toute ma famille.

A toutes mes amies sans distinction, je suis très heureuse des moments passés ensemble et ceux encore à venir.

A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous.

Dyhia





Dédicaces

Je dédie ce mémoire

En premier lieu à vous mes très chers parents, pour le soutien et leur confiance, aucun mot, aucune dédicace ne peut exprimer ma considération et l'amour éternel et pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

A ma chère sœur Ouassila

À la mémoire de ma chère grand-mère « Ferroudja » que dieu bénisse son âme.

A madame Affif Chaouch qui m'a encadré durant ce travail

A mon chère binôme Dyhia, ainsi qu'à toute sa famille.

Ainsi qu'à tous mes amis (es)

Wissem



Résumé

Bacillus cereus est connue pour être à l'origine de problèmes dans les industries alimentaires parce qu'elle affecte la qualité et la sécurité des aliments. Cette bactérie a une capacité à former des biofilms, ce qui représente un problème majeur dans l'industrie alimentaire y compris l'industrie laitière. Pour ce, plusieurs recherches ont été effectuées sur *Bacillus cereus* dans le lait de chèvre cru, qui occupe une place de premier plan parmi les micro-organismes préjudiciables dans les industries agroalimentaires, en raison de leur ubiquité et de leur capacité à former des biofilms et de résister sous forme de spore. Ainsi que, la recherche des molécules anti-biofilm à partir des métabolites des bactéries lactiques et des extraits des champignons endophytes.

Mots clé : Lait de chèvre, *Bacillus cereus*, biofilm, champignon endophyte, bactéries lactiques.

Abstract

Bacillus cereus is known to cause problems in food industry because it affects its quality and safety. This bacterium has the ability to form biofilms, which are a major problem in the food industry including the dairy industry. For this, several researches have been carried out on *Bacillus cereus* in raw goat's milk. The latter has a prominent place among harmful microorganisms in the food industry, due to their ubiquity and ability to form biofilms and to resist as a spore. As well as, the search for anti-biofilm molecules from the metabolites of lactic acid bacteria and extracts of endophytic fungi.

Keywords: Goat's milk, *Bacillus cereus*, biofilm, endophytic fungus, lactic acid bacteria.

Liste des abréviations

KJ : kilo Joule

pH : potentiel Hydrogène

TIA : Toxi-infections alimentaires

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives

Liste des figures

Figure 01: Composition de la matière grasse du lait	3
Figure 02: Différentes formes de <i>Bacillus cereus</i>	8
Figure 03: Composition de bio film bactérien	11
Figure 04: Différentes formes des bactéries lactiques.....	14
Figure 05: Observation Microscopique de la colonisation des racines par des endophytes fongiques	19
Figure 06: <i>Penicillium</i> sous-genre <i>Aspergilloides</i> Conidiophore mono-verticillé (x100)	22

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composants du lait de chèvre	2
Tableau 02 : Composition en lipide de lait de chèvre	3
Tableau 03 : Composition moyenne en g/l et distribution des protéines dans le lait de chèvre .	4
Tableau 04 : Composition du lait de chèvre en minéraux et oligo-éléments	5
Tableau 05 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chèvre	6
Tableau 06 : Flore originelle du lait cru	6
Tableau 07 : Caractères bactériologiques de <i>Bacillus cereus</i>	10
Tableau 08 : Différents genres des bactéries lactiques et leurs caractéristiques	15
Tableau 09 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	18
Tableau 10 : Critères de classification des champignons endophytes	20

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur le lait de chèvre cru

1. Définition.....	2
2. Composition.....	2
2.1. Matièregrasse.....	3
2.2 Matière protéique.....	3
2.3. Matière minérale.....	4
2.4. Vitamines.....	5
2.5. Glucides.....	5
2.6. Enzymes.....	5
3. Caractéristiques physico-chimiques.....	5
4. Microbiologie.....	6
4.1. Flore originelle.....	6
4.2. Flore contaminante.....	7
4.2.1. Flore d'altération.....	7
4.2.2. Flore pathogène.....	7

Chapitre II:Généralités sur *Bacillus cereus*

1. Définition.....	8
2. Ecologie.....	8
3. Classification.....	9
4. Caractéristiques.....	9
4.1. Caractéristiques morphologiques et structure cellulaire.....	9
4.2. Caractéristiques biochimiques.....	9

4.3. Caractéristiques bactériologiques	9
5. <i>Bacillus cereus</i> dans les industries agro-alimentaires.....	10
6. Pouvoir pathogène	10
6.1. Infection gastro-intestinale	10
6.1.1 Syndrome émétique.....	10
6.1.2. Syndrome diarrhéique	10
6.2. Infection non gastro-intestinale	11
6.2.1. Infection systémique	11
6.2.2. Infection locale.....	11
II. Formation des biofilms	11
1. Définition	
2. Composition	11
3. Processus de formation.....	12
3.1. Formation d'un film de conditionnement	12
3.2. Adhésion	12
a. Adhésion réversible	12
b. Adhésion irréversible.....	12
3.3. Croissance et maturation	12
3.4. Dispersion.....	12
4. Biofilm dans l'industrie laitière.....	13
5. <i>Bacillus cereus</i> en biofilm	13
6. Isolement et identification de <i>Bacillus cereus</i>	14
7. Formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i>	14

Chapitre III: Recherche des molécules anti biofilm

I. Bactéries lactiques.....	15
2. Définition.....	15
3. Habitat	15
4. Classification	15
5. Caractéristiques physicochimiques et biochimiques	17
6. Applications industrielles des bactéries lactiques et leurs métabolites	17
6.1. Domaine alimentaire.....	17
6.2. Domaine de santé.....	18
6.3. Application des métabolites des bactéries lactiques contre le biofilm	18
6.3.1. Bactériocines.....	18

6.3.2. Bio-surfactants	18
II. Champignons endophytes	
1. Définition.....	19
2. Diversité et classification	19
3. Importance et le rôle.....	20
4. Champignon endophyte et les métabolites secondaires	21
5. Classification des métabolites secondaires des champignons endophytes.....	21
5.1. Composés phénoliques ou aromatiques	21
5.2. Terpénoides.....	21
5.3. Alcaloïdes	21
5.4. Hétérosides.....	21
6. Penicillium.....	22
6.1. Définition	22
6.2. Classification	22
6.3. Habitat.....	23
7. Recherche d'une molécule anti-biofilm soit par un champignon endophyte ou par bactéries lactique.....	23
7.1. Isolement des bactéries lactiques.....	23
7.2. Isolement des champignon endophytes.....	23
7.3. Etapes d'extraction des métabolites secondaires.....	23
8. Elimination des biofilms	23
Conclusion	24
Références bibliographiques.....	25



Introduction



Introduction

En Algérie, la production du lait de chèvre a longtemps été développée à l'échelle familiale dans les régions montagneuses de la Kabylie, et consommé à l'état cru ou fermenté.

L'intérêt du lait de chèvre réside dans sa richesse en nutriment de base tels que : minéraux et oligo-éléments surtout en calcium, en phosphore, en potassium et en magnésium (St-Gelais *et al.*, 1999). Grâce à ça, il offre un environnement idéal pour la croissance de nombreux microorganismes qui sont repartit en deux grandes classes: originelle et contaminante.

La flore de contamination peut provoquer une altération du goût, texture, saveur et la dégradation des propriétés organoleptiques des produits laitiers et leurs durées de vie, elle peut également former des biofilms, c'est le cas de *Bacillus cereus*. Le biofilm est une communauté de microorganismes, fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. C'est en effet une source de contamination des aliments transformés par des germes indésirables.

Des recherches scientifiques ont été menées sur la formation du biofilm de *Bacillus cereus*. La production de biofilm dans la plaque de microtitration a été observée. Il s'est avéré très dépendant de la durée d'incubation, de la température et du milieu ainsi que des souches utilisées. Certaines souches ont montré la formation de biofilm en 24 heures, puis dispersées en 24 heures (Janneke *et al.*, 2006).

Une étude a montré que la Phomopsichalasin est une substance naturelle bioactive isolée de l'espèce endophyte *Phomopsis sp.* A démontré une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus* (Padhi *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, notre recherche s'intéresse à l'étude bibliographique de *Bacillus cereus* du lait de chèvre, les biofilms formés par cette bactérie et la recherche des molécules anti-biofilms à partir des bactéries lactiques ou des champignons endophytes.



Synthèse

bibliographiques





CHAPITRE I:

Lait de chèvre cru



Chapitre I: Généralités sur le lait de chèvre cru

1. Définition

Le lait est un aliment doté d'une haute qualité nutritive grâce à sa richesse en plusieurs éléments tels que les protéines, les peptides, le lactose, les matières grasses, il représente un des aliments adoptés aux différentes tranches d'âge et utilisé comme élément de base dans de nombreuses applications culinaires, industrielles et technologiques (Ghazi et Niar, 2011).

Le lait de chèvre est un liquide blanc mâte, caractérisé par une saveur particulière et un goût sucré. Il est sécrété par les glandes mammaires des femelles (Van werbeck, 2002). Il possède une valeur de premier ordre, compte tenu de sa fermentation lactique lente et de son faible pouvoir allergène que celui de vache (Zeller, 2005, Jouy et Abroumand, 2010).

2. Composition

La composition du lait de chèvre est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants. Il est constitué de 3 phases: un mélange d'une émulsion de matière grasse constituée de globules gras, une suspension colloïdale formée par les micelles de caséine et une solution contenant des éléments solubles dans l'eau à savoir le lactose, les protéines hydrosolubles et les sels minéraux (Fredot, 2009).

Le tableau suivant décrit la composition du lait de chèvre.

Tableau 1: Composants du lait de chèvre (Alaiset *al.*, 2002).

Constituants	Teneur en (g /l)
Eau	900
Matière sèche totale	140
Matière grasse	45-50
Caséine	30-35
Lactose	40-45
Matière minérale	8-10
Matière protéique	35-40

2.1. Matière grasse

La matière grasse du lait de chèvre est composée essentiellement de triglycérides et de divers acides gras présentant sous une forme globulaire (Wolff et Fabien, 1998) (fig. 1). Le tableau ci-dessous représente la composition du lait de chèvre en lipides.

Tableau 2: Composition en lipide de lait de chèvre (Chilliard, 1997).

Lipide	Composition (%)
Triglycérides	95
Glycéride partiel	3
Cholestérols	0.4
Phospholipides	1
Acide gras libres	0.6

La matière grasse du lait de chèvre est composée de : phospholipides, triglycérides solides et liquides, lipoprotéines, enzymes et agglutinines. La figure suivante illustre sa composition.

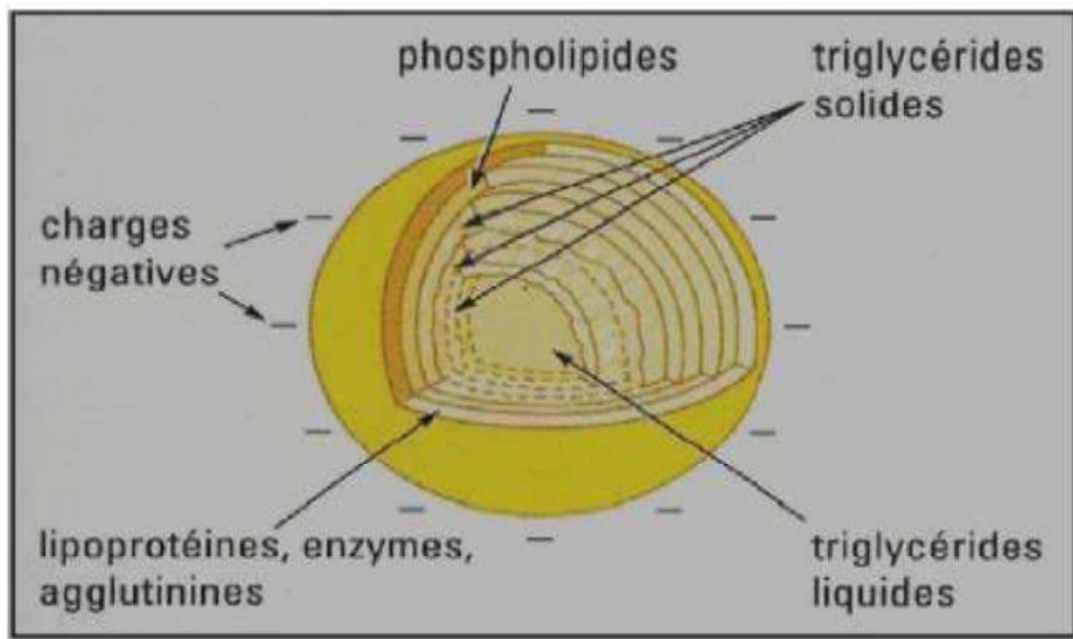


Figure 1: Composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).

2.2 Matière protéique

Le lait de chèvre est une source de protéines de très bonne qualité, il contient 30 à 35g par litre de protéines dont 80% de caséine, 19% de protéines solubles et 1% d'enzymes. La valeur nutritionnelle des protéines caprines est excellente car elle contient tous les acides

aminés indispensables à l'organisme (Soustre, 2007). Le tableau 3 montre la composition en protéines du lait de chèvre.

Tableau 3:Composition moyenne en g/l et distribution des protéines dans le lait de chèvre (Jouan, 2002).

Protéines	Concentration (g /l)
Total des protéines solubles (22%)	7,5
α -lactalbumine	2,0
β - lactoglobuline	4,4
Albumine sérique	0,6
Immunoglobuline	0 ,5
Total des caséines (71%)	24, 3
Caséine α -S1	3,5
Caséine α -S2	4,8
Caséine α	3,4
Caséine β	12,6
Azote non protéique (7%)	2,3
Protides totaux	34,1

2.3. Matière minérale

Le lait de chèvre est plus riche que d'autres laits en calcium, potassium, phosphore et magnésium (Van Werbeck, 2008), il contient également de nombreux oligo-éléments indispensables à l'organisme tels que le fer, zinc, cuivre et manganèse. Le tableau 4 montre la composition en minéraux et oligo-éléments du lait de chèvre.

Tableau 4:Composition du lait de chèvre en minéraux et oligo-éléments (St-Gelais *etal.*,1999).

	Composants	Quantité (g /l)
Les minéraux	Calcium	1,35
	Phosphore	0,92
	Potassium	1,55
	Sodium	0,37
	Chlore	2,20
	Magnésium	0,14
Les oligo-éléments	Zinc	3,20
	Cuivre	0,40
	Fer	0 ,55
	Manganèse	0 .6

2.4. Vitamines

Le lait de chèvre est riche en vitamines, parmi lesquelles la vitamine A, B, C, E, acide narcotiqueet l'acide folique (Charles *et al.*, 2005).

2.5. Glucides

Le glucide le plus essentiel dans le lait de chèvre est le lactose, après son hydrolyse par l'enzyme β -galactosidase deux molécules apparaissent:galactose et le glucose (St-Gelais *etal.*, 1999). Les glucides peuvent se trouver sous deux formes: libres ou associés aux protéines pour former des glycoprotéines (Amiot *et al.*, 2002).

2.6. Enzymes

Le lait de chèvre contient principalement trois types d'enzymes:l'hydrolase, la déshydrogénase (ou oxydase) et l'oxygénase (Vignola *et al.*, 2002).

3. Caractéristiques physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques du lait dépendent de l'ensemble des constituants (tableau5).

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques du lait de chèvre (Ait amer, 2008).

Valeur énergétique (KJ)	600-750
Densité du lait entier à 20°C	1.027-1.035
Point de congélation (°C)	-0.55 -0.583
pH	6.45-0.60
Acidité titrable (D°)	14-18
Tension superficielle du lait entier à 15°C (dynes/cm)	52
Conductivité électrique à 25°C (Ms/cm)	43 – 56×10 ⁻⁴
Indice de réfraction	1.35 – 1.46
Viscosité du lait entier à 20°C	1.8 – 1.9

4. Microbiologie du lait de chèvre

Le lait constitue un substrat très favorable au développement des micro-organismes grâce à sa richesse en nutriments, ce qui cause des altérations sur le produit, pour cela les bactéries retrouvées dans le lait de chèvre sont réparties selon leur importance en deux grandes classes: la flore indigène ou originelle et la flore contaminante qui est subdivisée en deux sous classes qui sont la flore d'altération et la flore pathogène (Vignola, 2002).

4.1. Flore originelle

Elle se définit comme l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, qui sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et les conditions d'élevage (Champagne *et al.*, 2000). Le tableau ci-dessous présente la liste des micro-organismes originaux du lait avec leurs proportions relatives.

Tableau 6: Flore originelle du lait cru (Vignola *et al.*, 2002).

Micro-organisme	%
<i>Micrococcus</i>	20-60
<i>Lactobacillus</i>	20-40
<i>Streptococcus</i> et <i>Lactococcus</i>	< 20
Gram négatif	< 5

4.2. Flore contaminante

Elle représente l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la suite d'une contamination. Celle-ci pouvant avoir lieu à plusieurs étapes, de la traite jusqu'à la consommation. Elle peut survenir:

- Au moment de la traite (hygiène du pis, des mains du trayeur ou de la salle de traite, etc.).
- Au moment de la transformation du lait en produits laitiers (fromages, yaourts, etc.) ;
- Au moment du transport et même durant la commercialisation (Heuchel *et al.*, 2001 ; Michel, 2002).

La flore contaminante se divise en deux groupes: la flore d'altération et la flore pathogène.

4.2.1. Flore d'altération

C'est une flore qui cause des défauts de fabrication du lait tels que: des changements sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduit la durée de vie de produits laitiers (Vignola, 2002).

Les germes impliqués sont:

- **Les *pseudomonas***: qui par leur rôle protéolytique ou lipolytique sont souvent responsables des anomalies de goût, de l'odeur du lait ou des produits laitiers.
- **Les entérobactéries**: sont indésirables en fromagerie car elles produisent des gaz et des acides pouvant induire des changements de texture, des saveurs désagréables ou un mauvais caillage (Vignola, 2002).

4.2.2. Flore pathogène

Sa présence peut être due à une infection de l'animal dont provient le lait ou d'un manque d'hygiène ce qui provoque des pathologies chez les consommateurs de lait (Pradal, 2012).

- ***Bacillus cereus***: affecte la qualité des aliments en changeant leurs textures et en développant des saveurs indiscernables.



CHAPITRE II:

***Bacillus sp* dans le lait cru de chèvre**



Chapitre II: Généralités sur *Bacillus cereus*

1. Définition

L'adjectif *cereus* vient du latin *cera*, voulant dire «cire» et qui fait référence à l'aspect cireux. *Bacillus cereus sensu stricto* est constitué de bactéries à grandes cellules dont la largeur est supérieure à $0,9\mu$ ayant une forme de bâtonnet.

- Groupée en chaînettes ou isolées.
- Coloration Gram-positif.
- Aéro-anaérobies facultatif.
- Mobiles grâce à une ciliature péritriche
- Sporulantes.

Les spores produites sont ellipsoïdes ou cylindriques et ne dilatent pas les sporanges (Lindbäck et Granum, 2013) (Fig.2).

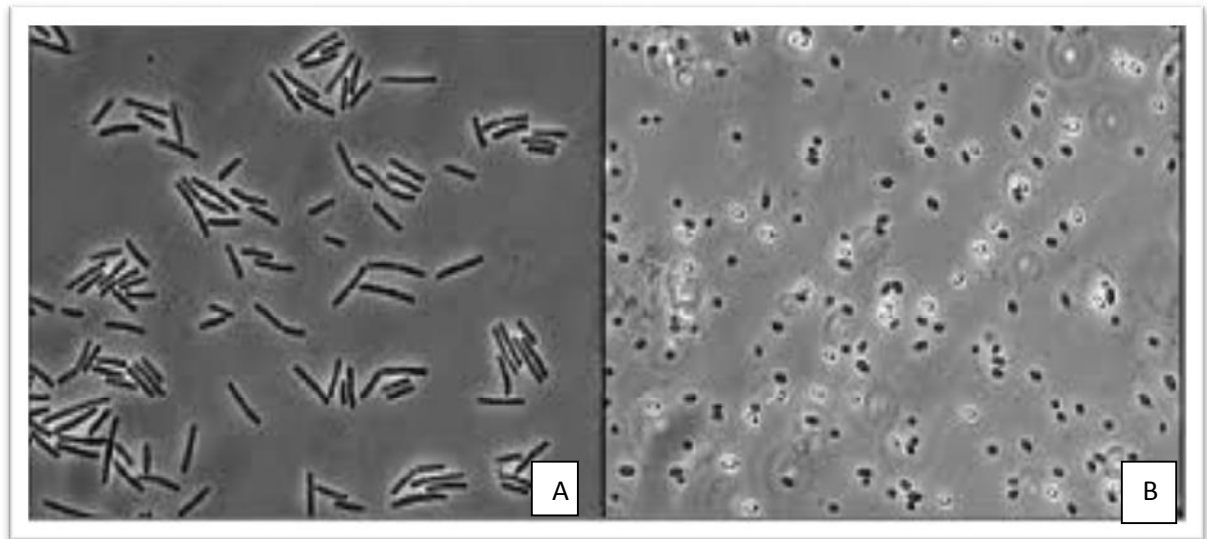


Figure 2: Différentes formes de *Bacillus cereus*

A: cellules végétatives, **B:** spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) sous microscopie optique.

2. Ecologie

Bacillus cereus est largement distribuée dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Le sol est considéré comme le réservoir principal de cette bactérie (Christiansson *et al.*, 1999).

Elle peut également contaminer différentes denrées alimentaires (riz, céréales, œufs, épices et le lait).

3. Classification

Règne: Bacteria

Division: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordre: Bacillales

Famille: Bacillaceae

Genre: *Bacillus*

Espec: *Bacillus cereus sensu stricto*(Guinebretiere *et al.*, 2008)

4. Caractéristiques

4.1. Caractéristiques morphologiques et structure cellulaire

- La teneur en G + C de l'ADN des espèces peut varier de 32 à 69 % (Prescott *et al.*, 2003).
- Les spores de *Bacillus* ont une forme ovale à sphérique, voire cylindrique, elles sont terminales ou non, mesurant en moyenne 1µm par 2µm (Lequette *et al.*, 2011; Mols et Abee, 2011).

4.2. Caractéristiques biochimiques

Les principales caractéristiques biochimiques de *Bacillus cereus* sont les suivantes:

- Résistance à la polymyxine.
- Synthèse d'une lécithinase (phospholipase C) par la plupart des souches.
- Une forte production d'enzymes, elle possède une phospholipase très active. Elle peut également réduire le nitrate en nitrite et métaboliser l'arabinose et le mannitol (Peiffer, 2000).
- Leur pH optimal est de 4,5.
- Leur température de croissance optimale se situe généralement entre 25°C et 37°C. Cependant, certaines souches (psychotrophes) peuvent se développer à une basse température de 4 à 10°C, tandis que d'autres souches résistantes à la chaleur peuvent être cultivées à une température pouvant atteindre 55°C (Wijnands *et al.*, 2006).
- La plupart des souches du groupe *B. cereus* sont hémolytiques et environ 50% peuvent hydrolyser l'amidon (Cadel Six *et al.*, 2012).

4.3. Caractéristiques bactériologiques

Les caractères bactériologiques utiles pour l'identification de *B. cereus* sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7: Caractères bactériologiques de *Bacillus cereus* (Gaillard, 1989).

Caractères bactériologiques	<i>B. cereus</i>
Mobilité	+
Hémolyse	+
Gélatine Lécithinase	Liquéfaction rapide
Colonies	Grisâtre, large, arrondie, aplatie, à contour irrégulier
Pénicilline G (6µg/ml)	Résistante

5. *Bacillus cereus* dans les industries agro-alimentaires

Bacillus cereus est connue pour être à l'origine des problèmes dans les industries alimentaires notamment l'industrie laitière car elle affecte la qualité et la sécurité des aliments, en changeant leurs textures et en développant des saveurs indésirables. Ces problèmes sont causés par les spores de *B. cereus* qui se forment à partir des cellules végétatives lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables (Abbas, 2014).

6. Pouvoir pathogène des *Bacillus cereus*

Grâce à sa capacité d'adaptation et son pouvoir à sécréter des toxines, *Bacillus cereus* peut provoquer deux types d'infections soit gastro-intestinales ou non gastro-intestinales.

6.1. Infection gastro-intestinale

Les toxi-infections alimentaires (TIA) de *B. cereus* se manifestent par deux types de syndromes: le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique. (Arnesen *et al.*, 2008).

6.1.1 Syndrome émétique

C'est une intoxication provoquée par l'ingestion d'un cyclique, toxine peptidique appelée Cereulide qui est préformée dans l'aliment, au cours de sa croissance. *B. cereus* provoque des vomissements, incoercibles et répétés, accompagnés de nausées, des céphalées, des douleurs abdominales, d'hypotension et parfois de diarrhée qui surviennent dans une période d'incubation de 1h à 5h heures suivant l'ingestion (Clavel *et al.*, 2004; Ceuppens *et al.*, 2012).

6.1.2. Syndrome diarrhéique

Causé par des entéro-toxines thermolabiles produites par *B. cereus* à l'intérieur de l'hôte, qui se traduit par des crampes abdominales et une diarrhée profuse. Elles apparaissent entre 8 à 16 heures après l'ingestion de l'aliment. (Clavel *et al.*, 2004, Ceuppens *et al.*, 2012)

6.2. Infection non gastro-intestinale

6.2.1. Infection systémique

B. cereus peut être à l'origine d'une septicémie, endocardite, infection de système respiratoire et de système nerveux centrale.

6.2.2. Infection locale

Bacillus cereus peut causer une infection postopératoire, abcès, brûlure, infection oculaire, arthrite.

II. Formation du Biofilm

La plupart des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes appelées « biofilms ».

1. Définition

Le biofilm est défini comme étant une association de micro-organismes, constituée de différentes espèces (bactéries, algues, champignons et/ou protozoaires), qui vivent en symbiose, dans lequel des cellules s'associent et adhèrent à une surface soit biotique ou abiotique pour s'y développer (Muhsin *et al.*, 2015).

Elles se caractérisent par leurs organisations internes, leurs métabolismes et la communication chimique qu'elles échangent entre elles (Tolker- Nielsen, 2000).

2. Composition du biofilm

Un biofilm bactérien est constitué de cellules bactériennes agglomérées entourées de la matrice qu'ils synthétisent. La matrice inclut tous les éléments du biofilm, l'un des composants principaux est l'eau et les polysaccharides sécrétés par les micro-organismes, il y a également de l'ADN, l'ARN et des lipides, des canaux et pores sont aussi présents pour permettre le flux d'eau, d'oxygène, de nutriments, et d'ions (Clutterbuck *et al.*, 2007) (Fig. 3).

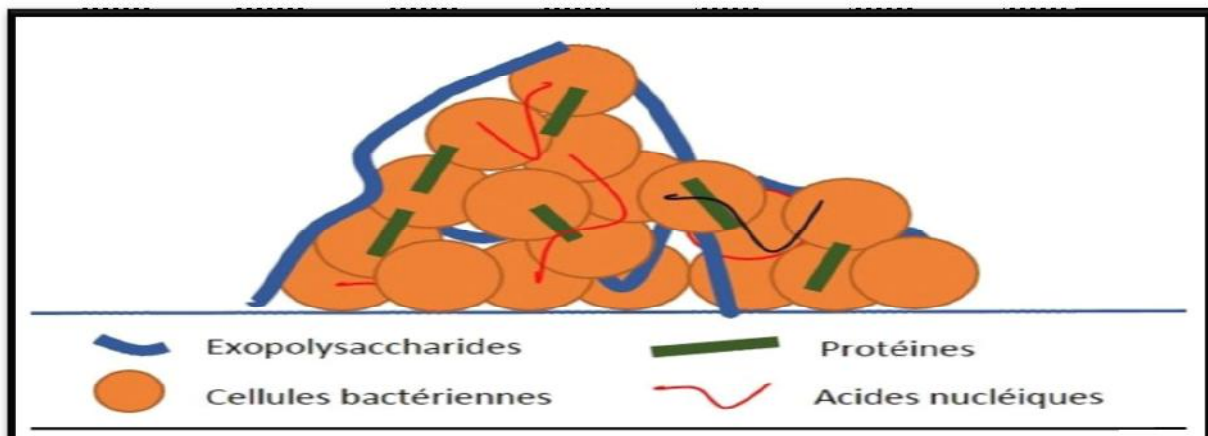


Figure 3: Composition de biofilm bactérien (Bentiba et Bentiba, 2017).

3. Processus de formation de biofilm

La formation d'un biofilm est un mécanisme complexe mais rapide, c'est une réponse à un stress environnemental ou un manque de nutriment ou d'oxygène. Ce processus se fait en 5 étapes.

3.1. Formation d'un film de conditionnement

C'est la phase de transport et d'attachement des cellules à une surface. Il y'aura une adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions (protéines, fragments protéiques, glucides, lipides...) qui recouvre cette surface. Ils vont servir de substrat aux micro-organismes qui vont adhérer à la surface. Ce film va modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (tension de surface, polarité) et inhiber ou stimuler l'adhésion bactérienne (Qian *et al.*, 2007).

3.2. Adhésion

Il existe deux types d'adhésion

a. Adhésion réversible

Elle consiste dans un premier temps en l'interaction entre les bactéries et un substrat solide, qui s'attachent de manière réversible par des liaisons chimiques non covalentes ou des liaisons faibles. En conséquence, elle peut facilement être altérée sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques (Schembri Kjaergaard et Klemm, 2003).

b. Adhésion irréversible

Cette adhésion correspond à une fixation spécifique des micro-organismes sur un support, grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules (Spiers *et al.*, 2003).

3.3. Croissance et maturation de biofilm

L'étape de croissance est caractérisée par une multiplication des cellules bactériennes adhérentes à la surface qui conduit à la formation des micro-colonies en recouvrant toute ou une partie de la surface (Tolker-Nielsen et Molin, 2000).

Ensuite, il y a l'étape de maturation qui est divisée en deux phases. Durant la première phase, on assiste à une synthèse des protéines du métabolisme anaérobie, pour la faible présence d'oxygène dans les zones proches du support. Durant la seconde phase, on assiste à une synthèse protéique importante nécessaire à la structuration et la différenciation des cellules bactériennes en biofilm mature (Clutterbuck, 2007).

3.4. Dispersion du biofilm

Le détachement des cellules associées aux biofilms intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables:

- Limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais.

- Apparition ou modification de la nature des nutriments disponibles.
- L'effet du vieillissement du biofilm.

Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement.

4. Biofilm dans l'industrie laitière

Les biofilms laitiers comportent un écosystème microbien complexe qui inclut des microorganismes pathogènes. Ces microorganismes indésirables sont impliqués dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire du produit fini, l'altération du lait ainsi que de la limitation de sa durée de vie. Les biofilms laitiers peuvent se former sur différents types de surface et particulièrement sur les équipements de transformation laitière.

5. *Bacillus cereus* en biofilm

Bacillus cereus a la capacité de se développer sous forme de biofilms immergés ou flottants, dans différents états physiologiques végétative ou sporulé. Dans l'industrie laitière, *B. cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilm. Ils sont formés quand les spores sont présentes dans le lait cru et survivent à la pasteurisation. Elles adhèrent alors aux surfaces d'acier inoxydable et germent quand les conditions sont favorables (finet *etal.*, 2001). Elles sécrètent une vaste gamme de métabolites, de bactériocines, d'enzymes et de toxines, ce qui peut être une source de contamination de produit fini.

Des recherches scientifiques ont été effectuées sur la formation de biofilm par *Bacillus cereus* en utilisant 56 souches de *B. cereus*, y compris les deux souches séquencées, ATCC 14579 et ATCC 10987. La production de biofilm dans des plaques de micro-titration s'est avérée fortement dépendante du temps d'incubation, de la température et du milieu, ainsi que la souche utilisée, avec certaines souches montrant la formation de biofilm dans les 24 h et la dispersion ultérieure dans les 24 h suivantes. Une sélection de souches a été utilisée pour l'analyse quantitative de la formation de biofilm sur des coupons en acier inoxydable. Des biofilms épais de *B. cereus* se sont développés à l'interface air-liquide, tandis que la quantité de biofilm formé était beaucoup plus faible dans les systèmes immergés. Cela suggère que les biofilms de *B. cereus* peuvent se développer en particulier dans les systèmes de stockage et de tuyauterie industriels (Janneke *et al.*, 2006).

6. Isolement et identification de *Bacillus cereus*

L'isolement est fait à partir du lait de chèvre cru. Après avoir préparé les échantillons et les ensemercer dans des boîtes Pétries contenant une gélose nutritive et l'incuber pendant 24 à 48 h à 37°C (Peng, 2001). Prendre les colonies caractéristiques et les purifier.

Et pour l'identification est fait en plusieurs étapes en se basant sur:

Caractéristiques macroscopiques: la forme, la taille, la couleur, l'aspect de surface, le contour.

Caractéristiques microscopiques: la coloration de gram et l'arrangement cellulaire, ainsi que en vérifiant l'arrangement cellulaire, la coloration de Gram, présence ou l'absence de la spore.

Caractéristiques biochimiques: par des tests tels que : test de catalase, test de coagulase.

7. Formation de biofilm de *Bacillus cereus*

Tester la formation du biofilm de *Bacillus cereus* avec la méthode des micro-plaques à 96 puits stérile, qui se fait par les étapes suivantes:

Introduction d'une suspension bactérienne préparée dans les puits de la micro-plaque et incubé pendant 48h à 37°C.

Après l'incubation, le biofilm formé subit des différents traitements pour arriver à la lecture.

La lecture se fait par deux méthodes : méthode directe qui se fait par observation à l'œil nu et méthode indirecte (méthode ELIZA) (Stepanovic et al., 2000).



CHAPITRE III:

Recherche des molécules anti biofilm



Chapitre III: Recherche des molécules anti biofilm

1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries bénéfiques qui produisent de l'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Elles occupent une place importante dans notre alimentation quotidienne.

2. Définition

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe hétérogène de microorganismes, ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, aéro-anaérobies facultatives, elles sont généralement immobiles, acidotolérantes (Zhang et Cai, 2014) et se trouvent sous deux formes soit cocci ou bacilles (Badis *et al.*, 2005) (Fig.4).

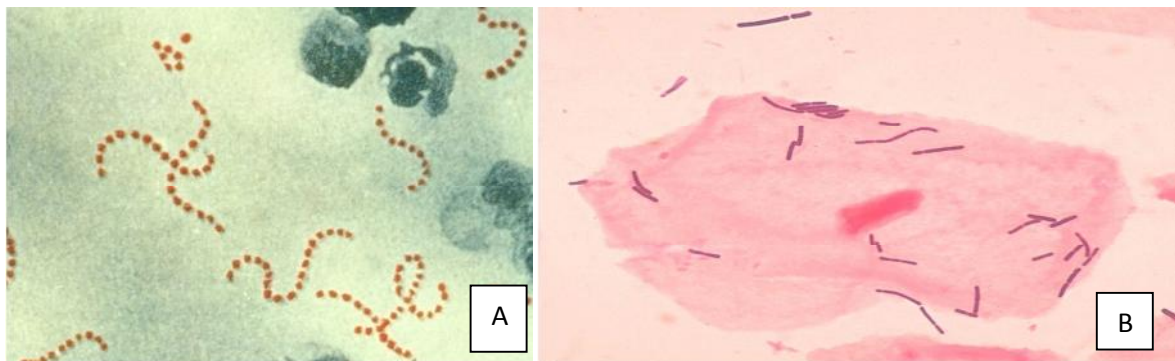


Figure 4:différentes formes des bactéries Lactiques.

A:Bactéries sous forme de coque: *Streptococcus pyogenes* (grossissement x900).

B:Bactéries sous forme de bâtonnets: *Lactobacillus acidophilus* (un bâtonnet mesure 1,5 à 6µm de long).

3. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels tels que les végétaux (légume tel que le concombre, fruit tel que les raisins des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales) et les produits laitiers. Elles font partie de la microflore naturelle de la bouche et du tractus intestinal de l'espèce humaine et de nombreux homéothermes (Achemchem, 2014).

4. Classification

Phylum:Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordre:Lactobacillales

Les principaux genres des bactéries lactiques sont présents dans le tableau suivant :

Tableaux 8: Différents genres des bactéries lactiques et leurs caractéristiques.

Genre	Forme et regroupement	T° ET Ph	Caractéristiques
<i>Lactobacillus</i>	Bacille longue et fine Groupée en chaîne	30°C à 40°C	-Aérobie. -Exigence nutritionnelle complexe.
<i>Lactococcus</i>	Coque en paire ou en chaîne	30°C pH neutre	-Anaérobie facultative. -Produisent des exopolysaccharides et des bactériocines.
<i>Streptococcus</i>	Sphérique ou ovoïdes en paire ou chaîne longue	Mésophile Neutrophiles	- Fermentation des carbohydrates produit acide lactique mais pas de gaz. -Aéro-anaérobie facultatif. -Exigence en nutriments.
<i>Entérocooccus</i>	Ovoïde isolé en paire ou en chaîne	10°C à 45°C	-Aéro-anaérobie. -Résistante à l'acide. -fermente l'arabinose et sorbitol.
<i>Leuconostoc</i> <i>Weiselia</i> <i>Oenococcus</i>	Forme chaîne	25°C à 40°C	-Anaérobie facultatif. -Catalase (-) oxydase (-). -Hétéro fermentaire.
<i>Pedicoccus</i>	Coque en tétrade	Mésophile	-Homofermentaire. -Incapable d'utiliser le lactose. -Son développement nécessite la présence de plusieurs facteurs de croissance.
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière en V Ou des coccoïde	36°C 43°C	-Anaérobie stricte. -Nitrate réductase. -Fermentation hétérolactique.
<i>Vagococcus</i>	Cocci		-Mobile. -catalase (-).

5. Caractéristiques physicochimiques et biochimiques

Ces bactéries sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et la cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentes cibles (Achemchem, 2014). En présence d'hème, la catalase et les cytochromes sont formés, ce qui réduit la quantité d'acide lactique produite (König et Fröhlich, 2009).

Ces micro-organismes ne produisent pas d'indole ni acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine, elles sont généralement mésophiles, avec une température de croissance optimale entre 20 °C et 30 °C, ou thermophiles entre 40 °C et 45 °C. (Jozala *et al.*, 2005; Carr *et al.*, 2002; Kotelnikova et Gelfand, 2002) et se développent en milieu acide, à des pH inférieurs à 5.

Sur la base de leur profil fermentaires, les bactéries lactiques peuvent être classées en trois grands groupes :

- **Homolactique:** si elles produisent de l'acide lactique exclusivement.
- **Hétérolactique facultatives:** si elles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique.
- **Hétérolactique stricte:** si elles produisent l'acide lactique, l'acide acétique, ou de l'éthanol et du CO₂ (Bactéries hétérolactiques strictes) (Leveau et bouix, 1993; Pilet *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 1996).

6. Applications industrielles des bactéries lactiques et leurs métabolites

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques très diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité leur donne un grand intérêt industriel d'où leur large spectre d'application dans de nombreux domaines alimentaires, pharmaceutiques, agricultures et vétérinaires.

6.1. Domaine alimentaire

En industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits alimentaires. Leur utilisation est déterminée par leurs propriétés technologiques telles que: les activités acidifiantes, et enzymatiques et production de métabolites d'intérêt (Belyagoub, 2014) (Tableau 9).

Tableau9:Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).

Genre	Substrat	Exemple de produit
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Lait fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait, viande, végétaux, céréale	Yaourt, jambon sec, bière
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromage, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Lait, Végétaux	Fromages, choucroutes
<i>Pediococcus</i>	Végétaux, viande	Choucroutes, saucisses
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourt, lait fermentés, fromages

6.2. Domaine de santé

Certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme des probiotiques telles que: *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri* (Salminen *et al.*, 2004).Elles sont également utilisées pour:

- Améliorer la digestion du lactose.
- Traiter certaines infections ou diarrhée.
- Diminuer le cholestérol sérique.
- Elaborer des vaccins (Calvez *et al.*, 2009).
- Produire des bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez *et al.*,2003).

6.3. Application des métabolites des bactéries lactiques contre le biofilm

Les bactéries lactiques possèdent des propriétés anti-adhésives relatives à la production de certains métabolites tels que les bactériocines, les bio-surfactants et les polysaccharides.

6.3.1. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens qui tuent ou bloquent le développement des bactéries. En effet, l'application de bactéries lactiques productrices de bactériocines pouvait contrôler la croissance d'agents pathogènes au sein d'un biofilm (Blanca *et al.*,2008; Winkelstroter *et al.*,2011).

6.3.2. Bio-surfactants

Les bio-surfactants ont été définis comme des molécules amphiphiles produites par des micro-organismes. En effet, elles sont impliquées comme une barrière compétitive vis-à-vis de l'adhésion des agents pathogènes (Lepargeur et Rousseau, 2002). L'addition de ces bio-surfactants à des biofilms matures accélérerait leur dispersion et altérerait leur morphologie.

II. Champignons endophytes

1. Définition

L'origine étymologique du mot « endophyte » provient du grec « endo » qui signifie « dedans » et « phyton » plante = à l'intérieur de la plante (Schulz et Boyle, 2006).

Les champignons endophytes sont des micro-organismes qui vivent toute ou une partie de leurs vies dans les feuilles, les rameaux, les troncs et les racines des plantes (Bérubé, 2007). Ils établissent des relations mutuelles sans causer aucun symptôme apparent (Hasegawa *et al.*, 2006). Ils reçoivent la nutrition et la protection de la plante hôte et en retour et améliorent la compétitivité ainsi que la résistance de celle-ci aux différents agents pathogènes (Fig.5).

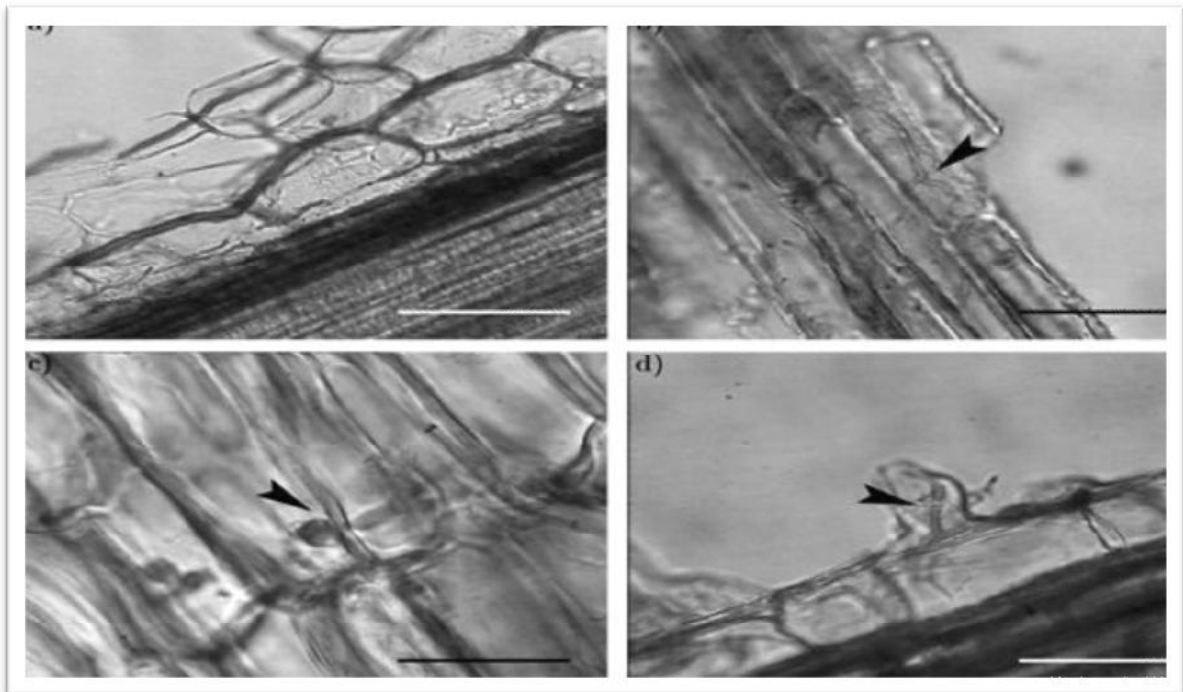


Figure 5: Observation Microscopique de la colonisation des racines par des endophytes fongiques (Macia Vicente *et al.*, 2008).

- A: Croissance intercellulaire du champignon endophyte dans les cellules épidermiques de *Sporobolus pungens*.
- B: Colonisation intracellulaire d'une cellule épidermique de racines de *Lygeum spartum*.
- C: Croissance intracellulaire du champignon endophyte avec gonflement de type appressorium (tête de flèche) pendant la pénétration de la paroi cellulaire dans le cortex de *Sarcocornia fruticosa*.
- D: Colonisation hyphale d'une racine de *L. spartum*.

2. Diversité et classification

Les champignons endophytes sont ubiquistes, ils ont été détectés presque dans toutes les plantes de façon qu'une même espèce est capable de coloniser plusieurs hôtes différents (Saikkonen *et al.*, 2004). Leur fréquence et leur abondance dépendent des conditions climatiques, édaphiques, l'hétérogénéité des habitats et des niches occupées par leurs hôtes (Sieber, 2002).

La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota*, cependant certains appartiennent à d'autres taxons *Basidiomycota*, *Zygomycota* et *Oomycota* (Saarek *et al.*, 2001). Ils peuvent être classés en deux groupes : les *Clavicipitaceae* et les *Non Clavicipitaceae*. (Rodriguez *et al.* 2009) et divisés en 4 classes (Tableau 10) selon la famille de l'endophyte concerné, la localisation dans les tissus de l'hôte et le mode de transmission.

Tableau 10: Critères de classification des champignons endophytes (Rodriguez *et al.*, 2009).

	<i>Clavicipitaceae</i>		<i>Non Clavicipitaceae</i>	
Critère	Classe1	Classe2	Classe3	Classe4
Gamme d'hôtes	large	Etroite	Etroite	Etroite
Tissus colonisés	Tige rhizome	et Tige, rhizome	racine, Tige	Racine
Colonisation, in	Etendue	Etendue	Limité	Etendue
<i>Planta</i>				
Biodiversité, in	Basse	Basse	Elevé	Inconnue
<i>planta</i>				
Transmission	Verticale horizontale	et Verticale horizontale	et Horizontale	Horizontale
Bénéfiques pour la plante hôte	NHA	NHA HA	NHA	NHA

Non adaptation à l'habitat (NHA pour Non habitat-adapted): présentent des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et la promotion de la croissance, communs entre les endophytes quel que soit l'habitat d'origine. Adaptation à l'habitat (HA pour Habitat-adapted): les avantages résultent des pressions sélectives spécifiques de l'habitat tel que le pH, la température et la salinité.

3. Importance et le rôle

Les champignons endophytes représentent une source importante de composés bioactifs naturels avec leurs applications potentielles dans l'agriculture, la médecine et l'industrie alimentaire (Tan et Zou, 2001). Ils peuvent aussi fournir plusieurs bénéfices aux plantes tels que la protection contre les maladies (Redman *et al.*, 1999, 2001), la production de métabolites secondaires efficaces contre les agents pathogènes de l'hôte (Liu *et al.*, 2001), la protection contre des insectes ravageurs (Azevedo *et al.*, 2000 ; Anke et Sterner, 2002) et la résistance aux herbivores (Latch, 1993).

Quelques endophytes ont la capacité de produire les mêmes métabolites secondaires ou des métabolites analogues que leurs plantes hôtes. Les produits naturels synthétisés par les champignons endophytes inhibent les organismes pathogènes y compris les bactéries, les champignons, les virus et les protozoaires (Al-Mahi *et al.*, 2013).

4. Champignon endophyte et les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine). Synthétisés par les micro-organismes avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. Comme elle peut être un produit d'un métabolite primaire (Tortora *et al.*, 2003).

5. Classification des métabolites secondaires des champignons endophytes

Les métabolites secondaires sont classés selon leur structure chimique en quatre groupes majeurs sont :

5.1. Composés phénoliques ou aromatiques

Les composés polyphénoliques sont abondants dans les plantes et les fruits et légumes comme (les fraise, la pomme, pomme de terre). Ils sont susceptibles de devenir des composants importants de la médecine. Parmi les composés phénoliques on cite: les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins, la lignine (Katarzynagoszes *et al.*, 2015).

5.2. Terpénoides

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures soit cyclique soit chaîne ouverte, leur formule brute est $(C_5H_x)_n$. Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique, on trouve: les substances volatiles des plantes, les glycosides, les caroténoïdes et les stérols (Bezzaz, 2014).

5.3. Alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose.

5.4. Hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules formées par combinaison d'oses et des substances non glucidique appelées aglycones ou guénines. Ce sont les substances du métabolisme secondaire les plus anciennement connues. Ils forment des substances de réserve localisées dans la vacuole cellulaire (Guignard, 2000).

Les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

Ils activent la sporulation (Mazur *et al.*, 1991; Calvo *et al.*, 2001).

Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelle (Kawamura *et al.*, 1999).

Activité antifongique, antivirales et antibactérienne, parmi les champignons qui ont une activité antibiotique on trouve le *penicillium*, depuis sa découverte les champignons ont été considérés comme une bonne source de composés médicaux. (Lu *et al.*, 2018).

6. *Penicillium*

6.1. Définition

Le genre *Penicillium* est un champignon (ou moisissure) qui fait partie des ascomycètes. C'est une espèce saprophyte, il est caractérisé par un mycélium septé et ramifié, se multiplie de manière végétative (conidiogénèse) en produisant sur les parties aériennes des conidiospores qui sont des spores non sexuées (conidies), la plupart des espèces sont constituées d'un thalle vert (Dantigny *et al.*, 2005)(Fig. 6).

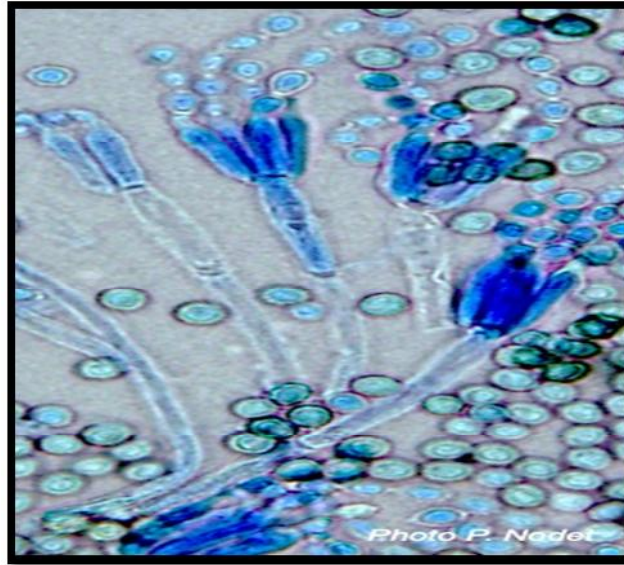


Figure6: *Penicillium* sous-genre *Aspergilloides* Conidiophore monoverticillé (x100)

6.2. Classification

Règne: Fungi
Phylum: Ascomycota
Classe: Euascomycetes
Ordre: Eurotiales
Famille: Trichomaceae
Genre: *Penicillium*

6.3. Habitat

On retrouve le pénicillium dans le sol, les matières organiques en décomposition et dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les arachides et les produits laitiers.

On le retrouve également poussant sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau, ainsi que dans l'air intérieur et la poussière domestique (Storey *et al.*, 2004).

7. Recherche d'une molécule anti-biofilm soit par un champignon endophyte ou par bactéries lactique.

7.1. Isolement des bactéries lactiques

Ce fait par ensemencement dans les milieux MRS et M17.

La purification en affectuent plusieurs repiquages dans le meme milieu.

La conservation dans une gélose incilné à 4°C.

7.2. Isolement des champignons endophytes

Rinçage de la plante avec l'eau de robinet pour les débarrasser des impuretés. Immersés dans l'éthanol 70% pendant une minute. Puis dans le NaOCl pendant 4 minutes. Remettre dans l'éthanol pendant 30 secondes rinçage avec l'eau distillé 3 fois. Séchage sur du papier filtre. Découpage. Mise en place dans des boîtes PDA. Incubation à 28°C. Purification par repiquage (Gangadevi *et al.*, 2008).

7.3. Etapes d'extraction des métabolites secondaires

Incubation des bactéries lactique dans le milieu MRS-saccharose le temps de faire une fermentation. Centrifugation et récupération du surnageant, le traité par le NaCl. Addition d'éthanol refroidie 96% pour précipiter les métabolites puis faire une centrifugation pour 20 minutes à 4°C, le culot obtenu sera lavé une autre fois par l'éthanol. Refaire la centrifugation 20 minutes à 4°C. Dissoudre le culot obtenu dans l'eau, puis faire une Lyophilisation (Ziadi *et al.*, 2018).

8. Elimination des biofilms

Malgré les progrès réalisés dans la connaissance des biofilms, les stratégies de lutte sont jusqu'à présent essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides et des détergents, et se heurtent encore au problème crucial de la résistance sessile (Mah *et al.*, 2012). Dans le domaine industriel, les techniques traditionnelles du nettoyage et de la désinfection sont les pratiques quotidiennes de lutte contre les biofilms. Malgré les nombreux travaux, les stratégies innovatrices notamment les stratégies vertes, telles que l'utilisation des phages, la modification de surface avec du polyéthylène glycol ou des revêtements antibactériens, l'emploi des détergents enzymatiques sont encore au stade de l'expérimentation au laboratoire (Falentin-Dauderé *et al.*, 2012).

Une étude a montré que la Phomopsichalasinine est une substance naturelle bioactive isolée de l'espèce endophyte *Phomopsis sp.* a démontré une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus*. L'acide collétotrique obtenu de *Colletotricum gloeosporioides* isolé à partir d'*Artemisia mongolica* a démontré une activité antimicrobienne contre les bactéries (Padhi *et al.*, 2013).

Certaines études ont également montré l'effet anti quorum sensing des extraits de *Lactobacillus sp.* En effet, Kowalska et son équipe ont montré que les extraits de *L. rhamnosus* LOCK 1131, *L. casei* LOCK 1132 et *L. paracasei* LOCK 1133 inhibent la signalisation intercellulaire chez *Salmonella sp.* et donc limite voire arrête la formation du biofilm (Kowalska *et al.*, 2019).



Conclusion



Conclusion

Le lait de chèvre présente une grande valeur nutritive à l'état cru néanmoins il doit être sévèrement contrôlé car il peut contenir des germes de contamination qui peuvent être pathogènes pour l'homme. Parmi ces microorganismes on trouve *Bacillus cereus* grâce à sa capacité à sécréter des toxines hémolytiques et des phospholipases qui jouent un rôle majeur dans la pathogénie et dans la gravité de ces infections. Elles peuvent former des biofilms qui sont reconnus à être la source des problèmes économiques et sanitaire.

En raison des conditions sanitaires (pandémie Covid-19), la partie expérimentale n'as pas été effectuée.



Références bibliographiques



Références bibliographiques

- **Abbas A.A. (2014).** Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. 12-29.
- **Achemchem F. (2014).** Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. Presses académiques Francophones.24-25p.
- **Al-Mahi I., Ietidal A. et Eihab I. (2013).** Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigeliaafricana*. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 5:1-9.
- **Alnnasouri, M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- **AMER MEZIANE L. (2008).** Aptitude des laits de chèvres et brebis à la coagulation par des protéases d'origine avicole. Thèse de Magister en science Agronomiques, 2008, pp.10-14 composition, propriétés physicochimiques, valeur.
- **AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. and CHEVALLIER I., (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. vol. 17, 454-461.
- **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R et Turgeon H., (2002).** Coelomic fluid of *A. taeniorhynchus* contains insecticidal and nematicidal metabolites from fungi. In: *The Mycota, Vol. X, Industrial Applications* (H.D. Osiewacz, K. Esser & J.W. Bennett, eds):109-128. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- **Arnesen L.P.S., Fagerlund A. Granum P.E. (2008).** From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 : 579-606.
- **Axelsson L., (2004).** Classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Salminen S, Wright AV et Ouwehand A). 3e Ed : Marcel Dekker, Inc. New-York. 1-66.
- **Azevadeo J. L., Maccheroni W., Pereira J. O. et de Araujo W. L. (2000).** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3: 1-36.
- **Badiset al. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia Et Kabyle". *Sciences & Technologie C – N°23*, juin, pp. 30-37.

- **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiellapneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université aboubekrbelkaid, Tlemcen.
- **BELYAGOUBI L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen. 170p.
- **Bérubé J. (2007).** Les champignons endophytes: un potentiel insoupçonné. L'éclaircie, catalogue du service canadien des forêts, P: 34 1-2.
- **Bezzaz. N. (2014).** Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentharotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique. M'sila : Université de M'sila. Algérie. Page :14.
- **Blanca E.G.A., Issac K.O., Cann S.E.M., Isabel G.L., Carlos R. (2008).** Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilm. *Food Control*. 19: 670–680.
- **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- **BYLUND G. (1995).** Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems. Lun Sweden, 436 p.
- **Cadel Six, S., De Buysse, M.-L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.-A., Pihier, N., Brisabois, A. (2012).** Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull Epidemiol Hebd* 45–49.
- **Calvez. S; Belguesmia. Y; Kergourley. G. (2009).** In bactériocines : de la synthèse aux applications in bactéries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.
- **Carr F.J., Chall D. Et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria; A literature survey. *Crit. Rev. microbial.*, 28; 4, 281-370.
- **Ceuppens, S., Rajkovic, A., Hamelink, S., Van de Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M., (2012).** Enterotoxin Production by *Bacillus cereus* Under Gastrointestinal Conditions and Their Immunological Detection by Commercially Available Kits. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 1130–1136.

- **Chilliard Y. (1997).** Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre - Comparaison avec les laits de vache et humain In: Freund G. (Ed.), Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre, INRA éditions, Paris, France, pp. 51-65.
- **Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. (1999).** *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk: Factors Affecting the Contamination of Milk During the Grazing Period. *J Dairy Sci*, 82: 305-314.
- **Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C & Schmitt P. (2004).** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97: 214-219.
- **Clair G, Armengaud J & Dupont C. (2012).** Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol Cell Proteomics* 11: 9.
- **Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121 (1-2), 1-17.
- **Danielle CLAVE. (2014).** FICHE TECHNIQUE : *Bacillus cereus*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Page 2.
- **Dentigny P. (2005).** Basis of productive mycology ; *International Journal of Food Microbiologie*.
- **Deshmukh S. K., Verekar S. A., Bhave S. V. (2015).** Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. *Frontiers in microbiology* 5, 1-34.
- **Dorto C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques; caractéristiques et intérêt pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotech. Agro. Société et environnement*. 13(1); 1-5.
- **Fredot E. (2009).** Connaissance des aliments : Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Editions Technique et Documentation, Editions Médicales internationales-Lavoisier (2e Ed.), Paris/Cachan, France, 400 p.
- **Guerrieri E., Simona N., Patrizia M., Carla S., Ramona I., Immacolata A., Moreno B. (2009).** Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*. 20: 861–865.
- **Guinebretiere, MH., Fagerlund, A., Granum, PE. et Nguyen-The, C. (2006).** Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:74–80.

- **Haddie J.M. (1986).** Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology*(Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1: 1070.
- **Hammes W.P. and Hertel C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*.Chap. 1.2.10. In prokaryotes. 4: 320-403.
- **Hammes W.P. and VOGEL R.F. (1995).** The genus *Lactobacillus*. *In: B. J. B. Wood and W.H. Holzapfel (Eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Elsevier Applied Science Publishers.* London, UK. 19–54.
- **HARAMI A. et HORFI M. (2006).** Contribution à la connaissance du camembert «Numidia». *Mémoire d'ingénieur d'état en industrie agroalimentaire.* Université Mentouri deConstantine. 50p.
- **Harjunpaa V., Teleman A., Koivula A., Ruohonen L., Teeri T T., Teleman O., Harrigan W.F. &McCance M.E. (1996).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.
- **Jooyandeh H. et Abroumand A. (2010).**Physico-chemical, nutritional, heattreatment effects and dairy product aspects of goat and sheep milks. *World Applied ScienceJournal.* 11 (11), 1316-1322.
- **Jouan P. (2002).**Lactoprotéines et lactipeptides: propriétés biologiques. Ed. INRA. 128 p.
- **JozalaA.f., de lencastreNovaes L.C., Cholessa O., Marous D. et Penna T.C.V. (2005).** Increase of nisin production by *Lactococcuslactis* in differente media. *Afr. J. Biotechnol.* 4; 3, 262-265.
- **Katarzynagoszez. (2015).**Antioxidants in cardiovasculartherapy: panacea or false hope? . *Frontiers in Cardiovascular Medicine;* 2:10.
- **Kowalska J. D., Nowak A., Śliżewska K., Tańczyk M., Łukasiak M. et Dastyh J. (2019).** Anti-Salmonella Potential of New *Lactobacillus* Strains with the Application in the Poultry Industry. *Polish Journal of Microbiology.* 69 (1) : 5–18.
- **Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsug T. (1999).** Targeted dissuption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japeneses pear pathotype of *Alternaria alternate*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12: 59- 63.
- **Khalid N.M. and marthe.H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. *In: Ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.

- **Kotelnikova E.A. et Gelfand MS. (2002).** Bactériocine production by gram-positive Bactéria and the mechanism of transcriptional. Regulation. Russian J. Genetics. 28; 6, 628-641.
- **König, H. et Fröhlich, J. (2009).**Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.Springer-Verlag,Berlin Heidelberg.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A.,Gruss A. et Le Loir Y. (2001).**Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcuslactis*. Lait 81,19-28.
- **Latch G. C. M. (1993).** Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts –biotic.
- **Lequette Y., Garenaux., Tauveron G. (2011).**Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. Journal of Applied and EnvironmentalMicrobiology. 77, 4905-4911.
- **Lepargneur J.P. et Rousseau V. (2002).** Rôle protecteur de la flore de Doderlein.Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.3:485-494.
- **Leveau J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel .Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.
- **Liesse Iyamba J-M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de*Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Librede Bruxelles d'Europe, France.
- **Lindbäck, T., and Granum, P. E. (2013).***Bacillus cereus*. In *Guide to Foodborne Pathogens*. LABBÉ, R.G., and GARCÍA, S. Wiley-Blackwell, 484 pp.
- **Liu C. H., Zou W. X., Lu H. and Tan R. X., (2001).** Antifungal activity of Artemisia annua endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology; 88: 277-282.
- **Lu Y., Haobin Z., Xixi Z., Xiaoguang X., Yichao D., Chunmei J Junling S., Dongyan S., Qingsheng H., Hui Y., Mingliang J. (2018).** Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology,biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. Applied Microbiology and Biotechnology 102, 6279–6298.
- **Macia-Vicente J. G., Jansson H. B., Mendgen K. and Lopez-Llorca L. V. (2008).** Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomycesgraminis* var. *tritici*. Canadian Journal of Microbiology. 54: 600-609.

- **Maldonadol N.C., Silva de Ruiz C., Cecilia M., Nader-Macias M.E. (2007).** A simple technique to detect Klebsiella biofilm-forming strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Méndez-Vilas. pp.52-59.
- **Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E. and Champ S.P. (1991).** Structure and synthesis of sporogenic spore factors from *Aspergillus nidulans*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 20: 1486- 1487.
- **Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013).** *Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agro-alimentaire. *ScienceLib Editions Mersenne*. 5, 130915.
- **Muhsin Jamal, Ufaq Tasneem, Tahir Hussain., Saadia Andleeb. (2015).** Bacterial biofilm ; its composition, formation and role in human infection. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- **Padhi L., Mohanta Y. A. K. & Panda S. K. (2013).** Endophytic fungi with great promises: A review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3 (3):152-170.
- **Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lb.delbrueckii* sp. *Bulgaricus* ATCC 11842. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique de Paris-Grignon.
- **Petrini O., Sieber T. N., Toti L. et Viret O. (1992).** Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1: 185-196.
- **Pilet M.F., Magras C. et Federighi M. (2005).** Bactéries lactiques. *In: bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica*. Paris. 219-240.
- **Prescott L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2003).** *Microbiologie*. Edition De boeck Ed. 2^{ème} édition française, 525-526 PP.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.-M. and Dusart J. (2010).** *Microbiologie*. De Boeck Université, 1164 pp.
- **Qian PY., Lau S., Dahms HU., Dobretsov S., Harder T. (2007).** Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology* 9, 399-410.
- **Qingsheng H., Hui Y., Mingliang J. (2018).** Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 6279–6298.
- **Ravelomanantsoa S.H. (2004).** Thèse. Les endophytes de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae): un modèle de relation plante – microorganismes. Université d'Antananarivo.

- **Ray C. G. (2004).** Enteric infections and food poisoning, In Ryan K. J., Ray C. G. (Eds.) Sherris Medical Microbiology, 4th edition, USA: Mcgraw Hill, 857-865.
- **Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J. et Henson J. M. (2002).** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*; doi: 10.1126/science.1078055.
- **Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ. (2001).** Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? *New Phytol* **151**: 705–716.
- **Redman RS, Freeman S, Clifton DR, Morrel J, Brown G, Rodriguez RJ. (1999).** Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiol* **119**: 795–804.
- **Rodriguez JM, Martínez MI, Horn N et Dodd HM. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 101-116.
- **Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E. et Redman R. S. (2009).** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, **182** (2): 314-330.
- **Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Salminen S. (2006).** Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from “villi” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*. **89**: 2355–2358.
- **Saikkonen K., Wäli P., Helander M., Faeth, SH. (2004).** Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in plant science*, **9**(6), 275-280.
- **Saikkonen K., Faeth S., Helander M. et Sullivan T. (1998).** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**: 319-343.
- **Saliminen. S., Ouweland A. et Von Wright A. (2004).** Lactic Acid Bacteria; microbial and functional aspect, 3rd ed Marcel Dekker. New York. 375-395.
- **Samson, R.A. and Pitt, J.I. (1985).** Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics.
- **Schulz B. et Boyle C. (2005).** The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, **109**: 661-687.
- **Schulz B. J. E. et Boyle C., et Sieber T. N. (2006).** What are endophytes? In Microbial Root Endophytes, in Shultz B. J. E., Boyle C. J. C., Sieber T. N., (eds), Springer. Berlin. Heidelberg, New York (U.S.A), 1-13.

- **Schembri MA., Kjaergaard K., Klemm P. (2003).**Global gene expression in Escherichia coli biofilms. *Molecular Microbiology* 48, 253-267.
- **Senequier A., Canard B. (2016).** Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécule d'intérêt thérapeutique. Université Grenoble Alpes. 102. -1
- **Sieber T. N. (2002).** Fungal root endophytes. In: *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., rev. and expanded (Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds, New York, Basel: Marcel Dekker, 887-917.
- **Soustre Y. (2007).** Les qualités nutritionnelles du lait et des fromages de chèvres. *Maison du lait. Questions sur n° 23 Mai-Juin.*
- **Souhilaboubrit et nafaaboussad. (2007).** Détermination in vitro du pouvoir anti bactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clou de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande type haché. Thèse doctorat. UMMTO.
- **ST-Gelais D.D., Ould-Baba A.M. et Turcot S.M. (1999).** Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. *Agriculture et Agroalimentaire, Canada*, 1-33.
- **Tamime A.Y. (1990).** Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. (Ed), *Dairy Microbiology*, vol. 2. *Elsevier, London*. pp. 131- 201.
- **Tan R. X. et Zou W. Z. (2001).** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448-459.
- **Tolker-Nielsen T., Molin S. (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology* 40, 75-84.
- **Tortora J., Funk B.F. et Case Ch.I. (2003).** Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada.
- **Van Den Hooven H. W., Spink C.A.E.M., Van De Camp M., Konings RNH., Hilbers C.W. et Van Den Van FJM. (1996).** Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelle of dodecylphosphocholine and of sodium, *Eur. J. biochem. J. Dairy Res.* 159; 21-28.
- **Vignola C.L., Michel J.C., Paquin P., Moineau M., Pouliot M. et Simpson R. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Techniques et documentation Lavoisier. 600p.
- **Wolff R.L. et Fabien R.J. (1998).** Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Le lait*, 69 : 33-46.

- **Zeller B. (2005).** Le fromage du chèvre : Spécificités technologiques et économique Thèse de Doctorat de l'Université Paul-Sabatier, Toulouse, France.
- **Zhang H. W., Song Y. C. et Tan R. X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports.*, 23: 753-771.
- **Ziadi M., Taroub B., M'Hir S., Zaafour K., Mokhtar K., Hamdi M., Boisset-Helbert C. (2018).** Evaluation of the Efficiency of Ethanol Precipitation and Ultrafiltration on the Purification and Characteristics of Exopolysaccharides Produced by Three Lactic Acid Bacteria. *BioMedresearch international.*