

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département : Microbiologie Appliquée  
et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم : الميكروبيولوجيا التطبيقية  
وعلوم التغذية

## Mémoire de Fin d'Études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Sciences  
de La Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Étude de quelques propriétés probiotiques des bactéries  
lactiques isolées des pickles et contrôle de qualité du  
produit fini

### Membres de Jury

Présidente : Dr BEKKA F  
Examinatrice : Dr ALIOUA S  
Encadrant : Dr BOUCHEFRA A



### Présenté par

M<sup>elle</sup> : BELKERDID Hind  
M<sup>elle</sup> : BOUANK Imen  
M<sup>me</sup> : BOUCHAIB Ines

Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) : .....

## *Remerciements*

*D'abord nous remerciant bien sur  
ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et  
le courage pour accomplir ce modeste travail.*

*Nos très spéciaux remerciements reviennent à notre encadrant Dr. BOUCHEFRA  
Amina pour nous avoir proposé ce sujet et pour tous les efforts et l'aide, nous lui  
sommes très reconnaissantes pour ces conseils, sa  
disponibilité et sa sérieuse dans le travail*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury : Dr. BEKKA F. et  
M<sup>me</sup> ALIOUA S. Qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.*

*Nous soulignons notre reconnaissance aux enseignants de la Microbiologie  
notamment M<sup>r</sup>. KHENOUF Tarek et M<sup>elle</sup> CHEKIRED Ibtissem pour ses aides,  
ses précieux conseils et leurs disponibilités.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement l'ensemble du personnel travaillant au  
laboratoire du département de la microbiologie appliquée et sciences alimentaire de  
l'Université de Jijel, qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de notre gratitude et  
de notre profond respect.*

*Finalement, nous remerciant tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin  
à l'accomplissement de ce mémoire.*

*A vous tous, un grand Merci.*

## *Dédicace*

*Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve...*

*A mes très chers, respectueux et magnifiques parents Ali et Fatiha qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études.*

*Aucune dédicace ne peut exprimer adéquatement mon profond amour pour vous.*

*Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie...*

*A mes frères Yahia, Abdelkhalék, Abdessamia, Badreddin et ma sœur Meriam et ses enfants pour leurs appuis et leur encouragement.*

*Je vous aime beaucoup.*

*A tous mes amies, mon trinôme Imen et Ines et également à tous les collèves de la promo surtout Faiza.*

*A tous ce qui de loin ou de près n'ont pas cessé de m'apporter leur soutien, pendant mes années d'études.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*Merci à toutes et à tous.*

*Hind*

## *Dédicace*

*Avant tous, Mes profonds remerciements vont à ALLAH qui m'a aidé et donné la patience et le courage pendant ces années d'étude.*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chères parents Kamel et Massika, les deux personnes les plus précieuses au monde*

*Qui m'ont appris tout ce que je sais*

*Qui m'ont guidé vers le tunnel éclairé du savoir*

*Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort*

*Qui m'ont encouragé durant tous mon cursus universitaire, je souhaite qu'ils soient heureux pendant toute leur vie.*

*A mes frères Aziz, Mohamed et Ziad, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A tous les membres de ma famille : mes grands-parents, mes grands-mères, mes tantes, oncles, mes cousins, mes cousines paternelle et maternelle*

*A mon trinôme Ines et Hind pour cette expérience inoubliable avec vous*

*A mes chères Meriem, Chafia, Samsouma et Mina merci pour tes encouragements, tes assistances et tes soutien moral vous avez toujours cru en moi.  
Que dieu vous préserve !*

*A mes amies Lamis, Loubna, Ahlem , Nour, Ahlem, Asma, Amel ,Manel, Khaola, Yamina , Faiza ,meriem .....*

*A toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide*

*Je vous dis Merci*

*Amen*

## *Dédicace*

*Avec l'aide d'Allah J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :*  
*Mes très chers parents Abdelkader et Zohra pour leur soutien et leur sacrifice tout*  
*au long de mon parcours et qui ont cru en moi, qu'Allah leur accorde une*  
*longue vie, encore une fois **Merci...***

*A mes sœurs Hakima et El-batoul. A mon frère Houssemeddine et sa femme,*  
*auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde avec leurs*  
*petites familles.*

*A ma nièce Israa, ainsi aux petits membres de ma famille... je vous aime !*

*A mon mari qui ne cesse de me conseiller, m'encourager et me soutenir.*

*A tous les membres de ma belle-famille.*

*A Mr AMIRAT Yacine et son équipe de travail.*

*A mes proches amies et mes cousines, auxquels je souhaite plus de succès.*

*A mon trinôme Imen et Hind pour cette expérience et tous ce qu'on a passé*  
*ensemble.*

**INES**



# **Table des matières**

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction .....	1
<b>I.Synthèse bibliographique</b>	
I.1.Historique .....	3
I.2. Définitions .....	3
I.3. Les pickles à travers le monde.....	3
I.3.1. Kimchi.....	5
I.3.2. Câpres.....	5
I.3.3. Olives de table .....	5
I.3.4. Choucroute .....	5
I.3.5. Concombres fermentés.....	6
I.4 Méthode de préparation du concombre lactofermenté (pickles) .....	6
I.4.1. Méthode traditionnelle .....	6
I.4.2. Méthode moderne .....	7
I.5. Valeur nutritionnelle .....	7
I.6. Bienfaits du concombre lactofermentés .....	8
I.6.1. Amélioration des propriétés sensorielles.....	8
I.6.2. Amélioration de la digestibilité .....	8
I.6.3. Effet antioxydant.....	8
I.6.4. Élimination des composés antinutritionnels endogènes.....	8
I.6.5. Effet probiotique .....	8
I.7. Définitions du terme probiotique.....	9
I.8. Principales souches bactériennes au potentiel probiotique .....	9
I.8.1. Bactéries lactiques .....	10
I.8.2. Bifidobactéries .....	11

I.9. Caractéristiques souhaitables des probiotiques .....	11
I.10. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques .....	12
I.10.1. Critères de sécurité.....	12
I.10.2. Critères technologiques .....	12
I.10.3. Critères fonctionnels .....	12
I.11. Modes d'action des probiotiques .....	12
I.11.1. Renforcement de fonction barrière .....	13
I.11.2. Production de substances antimicrobiennes .....	14
I.11.3. Concurrence pour l'adhésion.....	14
I.12.Principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine .....	15
I.12.1. Soulagement de la constipation .....	15
I.12.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme .....	16
I.12.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées.....	16
I.12.4. Réduction du taux de cholestérol sanguin .....	16

## **II. partie expérimentale**

II.1. Processus de préparation du concombre lactofermenté.....	18
II.2. Analyse physicochimique .....	18
II.2.1. pH et acidité titrable.....	18
II.2.2. Teneur en humidité .....	19
II.2.3. Teneur en minéraux .....	19
II.2.4. Détermination de la teneur en protéines .....	19
II.3. Analyse microbiologique du concombre lactofermenté .....	20
II.3.1. Préparation de la solution mère .....	20
II.3.2. Dénombrement de la flore totale aérobies mésophiles .....	20
II.3.3. Dénombrement des levures et moisissures .....	21
II.3.4. Dénombrement des bactéries lactiques .....	21
II.4. Isolement et pré-identification des bactéries lactiques .....	21
II.5. Conservation des isolats.....	22



II.6. Étude de quelques propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées du concombre lactofermenté .....	22
II.6.1. Résistance aux sels biliaires .....	22
II.6.2. Résistance au pH gastrique .....	23
II.6.3. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation .....	23
II.2.6.4. Test d'hydrophobicité.....	24
II.6.5. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial .....	24

### **III.Résultats et discussion**

III.1. Caractéristiques physicochimiques du concombre lactofermenté .....	26
III.2. Caractéristiques microbiologiques du concombre lactofermenté .....	27
III.2.1. Microflores du concombre lactofermenté, isolement et pré-identification des bactéries lactiques.....	27
III.2.2. Quelques aptitudes probiotiques des BL sélectionnées .....	29
III.2.2.1. Test d'auto/ Co-agrégation .....	29
III.2.2.2. Test d'hydrophobicité .....	32
III.2.2.3. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial .....	33
III.2.2.4. Résistance aux sels biliaires et au pH gastrique .....	35
Conclusion.....	38
Références .....	39
Annexes	

% : Pourcentage

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique

°C : Degré Celsius

°F : Degré Fahrenheit

ADH : l'arginine dihydrolase

AOAC : Association des Chimistes Agricoles Officiels

BL : bactéries lactiques

DO : Densité Optique

FAO: Food and Agriculture Organization

G+G: Guanine+ Cytosine

HCl : Acide chlorhydrique

ISO : Organisation internationale de normalisation

MRS : De Man-Rogosa et Sharp

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

OGA : Gélose glucose à l'extrait de levure et à l'oxytétracycline

PBS: phosphate urée sulfate magnésium.

PCA : Plate Count Agar

PH : potentiel d'hydrogène

rpm : Rotation par minute

spp : sous-espèces

Tr : Tour

UFC : Unité Formant Colonie

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Tableau	Page
<b>Tableau 1:</b> Exemples de produits végétaux lactofermentés consommés dans le Monde .....	4
<b>Tableau 2:</b> Classification de bactéries lactiques considérées comme probiotiques .....	10
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques physicochimiques du concombre lactofermenté .....	27
<b>Tableau 4:</b> Microflores dénombrées dans le concombre lactofermenté. ....	27
<b>Tableau 5:</b> Caractéristiques biochimiques des bactéries lactiques isolées du concombre lactofermenté. ....	29

Figure	Page
<b>Figure 1:</b> Mécanismes d'action des probiotiques .....	13
<b>Figure 2:</b> Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques .....	15
<b>Figure 3:</b> Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur gélose MRS.....	28
<b>Figure 4:</b> Aspect microscopique des bactéries lactiques après coloration de Gram (x100).....	28
<b>Figure 5:</b> Pourcentage d'auto-agrégation des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 isolées du concombre lactofermenté. ....	31
<b>Figure 6:</b> Pourcentages de coagrégation des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 avec E. coli, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus. ....	32
<b>Figure 7:</b> Pourcentage d'hydrophobicité des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 isolées du concombre lactofermenté. ....	33
<b>Figure 8:</b> Photomicrographie de Cellules épithéliales saines. ....	34
<b>Figure 9:</b> Photomicrographie d'adhésion des bactéries lactiques Lb1 (a) et Lb6 (b) aux cellules épithéliales. ....	34
<b>Figure 10:</b> Pourcentage de survie des bactéries lactiques Lb1 et de Lb6 en présence de 0,3% de sels biliaires. ....	36
<b>Figure 11:</b> Pourcentage de survie des bactéries lactiques Lb1 et de Lb6 aux pH 2,pH 3 et pH 4.....	37



# **Introduction**

Les légumes constituent le fondement d'une alimentation équilibrée et saine, particulièrement du point de vue des micronutriments. C'est la source de nombreux nutriments essentiels, notamment les glucides, les protéines, les graisses, les huiles, les vitamines et les minéraux **(Sultana et al., 2014)**.

La fermentation, la congélation et la transformation sous forme liquide sont des méthodes pour conserver les légumes et améliorer leur valeur nutritive et sensorielle **(Peng et al., 2018)**.

La fermentation des légumes est un moyen de transformer les légumes en pickles, en exploitant les microorganismes bénéfiques, mais ce procédé exige certaines conditions de production. La fermentation végétale comprend un environnement microécologique qui renferme divers microorganismes, comme les bactéries lactiques, les levures et les bactéries acétiques. Parmi tous les microorganismes impliqués dans la fermentation des légumes, les bactéries lactiques sont les genres prédominants utilisés pour la fermentation **(Peng et al., 2018)**.

Les pickles sont produits à travers le monde par fermentation lactique spontanée mais aujourd'hui ils évoluent pour répondre aux défis de qualité, de sécurité et de production de masse, ce qui nécessite le contrôle des matières premières, des écosystèmes microbiens et des processus de fermentation **(Behera et al., 2020)**.

Le concombre est l'un des légumes les plus sains et les plus nutritifs, il est riche en antioxydants, anticarcinogènes, anti-hyaluronidase, anti-élastase, anti-inflammatoires, anti-hyperglycémique, diurétiques, amylolytiques, les antimicrobiens et les analgésiques. Il est largement utilisé dans le domaine des soins pharmacologiques. Par ailleurs, le concombre fermenté est une source de probiotiques et de fibres **(Uthpala et al., 2020)**.

Les bactéries lactiques isolées des concombres fermentés sont proposées comme probiotiques à cause de leurs propriétés thérapeutiques et prophylactiques potentielles **(Zieliński et al., 2017)**. Le système digestif est un écosystème complexe comportant des barrières physiques et chimiques contre les microbes ingérés, Une bactérie probiotique doit satisfaire à diverses exigences pour survivre dans un milieu si hostile. Cela comprend la résistance à la bile et au pH bas, les sucs gastriques, et la capacité à adhérer et à coloniser l'épithélium intestinal. En outre, il comprend l'auto-agrégation, la co-agrégation et l'adhésion des microorganismes aux solvants **(Khalil et al., 2018)**.

Les légumes traditionnels font partie intégrante de l'héritage gastronomique et alimentaire des pays d'Afrique du Nord. Le produit considéré dans le présent document appelé "les pickles de concombre" est obtenu par fermentation spontanée du concombre frais. Par ailleurs, un aspect très important est que ce produit, peut constituer une précieuse source de biodiversité, pour isoler

les cultures lactiques aux propriétés probiotiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était : d'évaluer le potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées du concombre à fermentation traditionnelle ainsi que la qualité nutritionnelle du produit.

Ce manuscrit est divisé en trois parties, dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique des connaissances courantes sur les pickles, la méthode de préparation des pickles de concombre, leur valeur nutritionnelle et leur bienfait. De plus, un aperçu sur les probiotiques et les bactéries lactiques leurs critères de sélection, leurs modes d'action et leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. La seconde partie a pour but de présenter la méthodologie utilisée pour résoudre la problématique posée tel que le teste d'auto et co-agrégation ,l'hydrophobicité , l'adhésion in vitro au tissu épithéliale et la résistance aux sel biliaires et aux pH gastrique . La dernière partie aborde les résultats expérimentaux obtenus à partir de l'interprétation et la discussion.



# **Synthèse bibliographique**



### I.1. Historique

Le "**pickling**" est l'une des méthodes de conservation des aliments les plus anciennes et les plus réussies connues de l'histoire de l'homme (**Behera et al., 2020**). Il est tellement ancien que l'on ne peut déterminer avec exactitude à quand remonte la production des premiers pickles (**WHO, 1993**). Cet art de conservation des végétaux a été adopté par différentes cultures à travers le monde ; pour permettre leur conservation pendant plus de deux ans sans réfrigération (**Behera et al., 2020**). La première référence de légumes fermentés a été trouvée en Chine lors de la construction de la Grande Muraille et constituaient la base de l'alimentation des travailleurs (**Bautista-Gallego et al., 2020**).

### I.2. Définitions

- Le terme "**pickles**" est dérivé du mot néerlandais "Pekel", qui signifie saumure (**Mani et al., 2017**).
- Le mot "**pickling**" est défini comme un processus dans lequel du sel et/ou du vinaigre est ajouté en solution comme moyen de conserver un aliment (**Al-Shawi et Alneamah, 2021**).
- Les "**pickles de concombre**" sont définis comme un produit obtenu à partir de concombres frais, additionnés d'épices aromatiques et d'aromatisants, recouvert d'une solution de sel de table et soumis à une fermentation lactique (**Zieliński et al., 2017**).

### I.3. Pickles à travers le monde

Divers produits lactofermentés à base de fruits et de légumes sont utilisés depuis longtemps en alimentation humaine. Les produits de renommée mondiale sont : le concombre, le kimchi, la choucroute, les âpres, les olives de table, etc... (**Bautista-Gallego et al., 2020**). Les principaux aliments d'origine végétale lactofermentés consommés dans le Monde sont répertoriés dans le **tableau1**.

**Tableau 1** : Exemples de produits végétaux lactofermentés consommés dans le Monde (Di Cagno et Coda , 2014).

<b>Produits Lactofermentés</b>	<b>Principaux ingrédients</b>	<b>Bactéries lactiques</b>	<b>Pays d'origine</b>
<b>Sauerkraut</b>	Chou, sel	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Europe, USA
<b>Cucumbers</b>	Concombres, vinaigre, sel	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	USA, Asie
<b>Capers</b>	Câpres, eau, sel	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. brevis</i>	Pays méditerranéens (Grèce, Italie, Espagne, Turquie, Maroc)
<b>Kimchi</b>	Chou, radis, sel, épices, autres légumes (gingembre, poivre, ail, oignon)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	Corée
<b>Khalpi</b>	Concombre	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. fallax</i> , <i>Pediococcus spp</i>	Himalaya oriental
<b>Tursu</b>	Concombre, choux, tomates vertes, poivrons verts et autres légumes	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Turquie

### I.3.1. Kimchi

Le kimchi est un légume fermenté traditionnel qui existe depuis longtemps en Corée, c'est un aliment de base de la nourriture coréenne (Di Cagno et Coda , 2014). Il est préparé traditionnellement à partir des légumes suivants : Chou chinois (beachu), radis, oignon vert, poudre de piment rouge, ail, gingembre et fruits de mer fermentés (jeotgal), et servis en accompagnement des repas avec le sel (Di Cagno et al., 2013).

Les bactéries lactiques présentes dans le kimchi sont : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, et *Weissella koreensis* (Di Cagno et Coda , 2014). Le kimchi est riche en composés antioxydant, comme les flavonoïdes, les phénols et les stérols qui possèdent des effets contre l'obésité, le cancer et l'athérosclérose (Fessard, 2017 ;Behera et al., 2020).

### I.3.2. Câpres

Le Capparis (*Capparis spinosa L.*) est un fruit consommé fermenté selon des méthodes traditionnelles sous le nom de câpre. C'est l'un des ingrédients de base de la nourriture méditerranéenne ; en particulier en Grèce, l'Italie, la Turquie, le Maroc et l'Espagne (Ashaolu et Reale, 2020). *L. plantarum* est l'espèce principale isolée de la saumure des câpres (Di Cagno et al., 2013).

### I.3.3. Olives de table

Les olives de table sont les légumes lactofermentés traditionnels les plus courants, et leur demande ne cesse d'augmenter dans le monde (Şanlıer et al., 2019). Plusieurs espèces de bactéries lactiques (BL) ont été isolées des olives de tables tel que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc mesentoroides* (Behera et al., 2020).

### I.3.4. Choucroute

La choucroute est un légume lactofermenté largement consommé dans de nombreux pays Européens et aux États-Unis. Elle est fabriquée par une fermentation lactique spontanée de chou blanc (*Brassica oleracea L. var. capitata*) (Di Cagno et Coda , 2014). Les bactéries lactiques présentes naturellement dans la choucroute telle que *Leuc. mesenteroides*, *L. brevis* et *L. plantarum* produisent une grande quantité d'acide lactique qui abaisse rapidement le pH, et confère par la suite des propriétés sensorielles au produit fini (Fessard, 2017). En plus des bactéries lactiques, la choucroute contient également des levures et des champignons, ceci

explique sa richesse en vitamines C et B, des minéraux comme le calcium, le fer, le potassium, le phosphore et des composés phénoliques (Şanlier et al., 2019)

### I.3.5. Concombres fermentés

Généralement les concombres sont consommés frais, mais ils jouissent d'une grande popularité dans le monde en tant que concombres fermentés. Ils sont généralement fermentés avec des bactéries lactiques naturelles de concombre, du vinaigre ou de la saumure (Prasad, 2019). *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp* et *Pediococcus spp* sont les principales bactéries lactiques naturellement présentes à la surface du concombre et responsables de la fermentation (Di Cagno et Coda, 2014). La fermentation permet de prolonger la durée de conservation des concombres et améliore les attributs nutritionnels et sensoriels, notamment la saveur, la couleur, la digestibilité des nutriments et la stabilité, tout en réduisant la toxicité et les constituants responsables d'effets indésirables comme l'acide phytique (composés phénoliques au goût amer) et en éliminant également des facteurs antinutritionnels endogènes comme l'oxalate, la lectines et les tanins (Zieliński et al., 2017 ; Bell et al., 2018 ; Azcarate-Peril et al., 2019).

### I.4 Méthode de préparation du concombre lactofermenté (pickles)

#### I.4.1. Méthode traditionnelle

De nombreux pickles peuvent être préparés par fermentation lactique grâce à la fermentation spontanée (Guillou et Floros, 2012). La fermentation spontanée est réalisée par certains genres de BL naturellement présentes à la surface du concombre, notamment le genre : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* et *Lactococcus*. Mais les *Lactobacillus* restent les prédominantes, car elles se caractérisent par un taux de croissance élevée et sont plus tolérantes au sel (Fessard, 2017). La fermentation se déroule en milieu anaérobie selon les étapes suivantes :

- **Prétraitement des concombres**

Le traitement consiste à immerger le concombre dans l'eau afin de se débarrasser de tous les parasites et les poussières à la surface du concombre. Le second traitement est un lavage-brossage du concombre pour réduire le nombre de microorganismes qui interfère avec la croissance de la flore lactique (Zieliński et al., 2017).

- **Processus de lactofermentation**

Le concombre frais est placé dans l'eau pure salée (2–5%) à une température modérée allant de 15°C à 18°C (Zieliński et al., 2017). La fermentation commence spontanément à partir de la

microflore présente à la surface de concombre (**Voidarou et al., 2020**). Le concombre est stocké dans des bouteilles stériles et conservées durant un an ou plus (**Zieliński et al., 2017**).

### I.4.2. Méthode moderne

Les concombres sont triés selon leurs tailles, lavés et découpés en morceaux égaux, puis dirigés vers la cuve de fermentation, ensuite le sel est ajouté dans le but de créer un milieu de culture anaérobie favorable à la croissance des bactéries lactiques (**Prasad, 2019**). Le processus moderne de préparation des concombres lactofermentés passe par les étapes suivantes :

- **Acidification directe et pasteurisation** : Le temps nécessaire pour que le pH du produit s'équilibre doit être suffisamment court pour qu'aucun micro-organisme n'ait le temps de se développer ou produire des toxines ou provoquer des détériorations. Une étape de pasteurisation qui suit l'acidification consiste à un chauffage jusqu'à ce que la température interne du concombre atteigne 74°C (165°F) pour détruire certains microorganismes pathogènes (**Featherstone, 2015**).
- **Ajout d'un conservateur suivi d'une réfrigération** : Addition directe du vinaigre jusqu'à un pH équilibré de 4,6 ou moins pour protéger le produit contre les altérations, suivie d'une réfrigération pour empêcher le développement des microorganismes (**Featherstone, 2015**).
- **Ajout d'un ferment ou starters** : L'utilisation des starters pure ou mixte pour leur potentiel fermentaire, tels que *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* et *L. acidophilus*, permet d'obtenir des produits finis standardisés et de haute qualité (**Zieliński et al., 2017**). Il est préférable lors de l'emballage d'ajouter des épices, l'acide acétique et des résidus d'acide lactique (**Al-Shawi et Alneamah, 2021**).

### I.5. Valeur nutritionnelle

Pendant la fermentation, l'enrichissement biologique des substrats alimentaires avec des acides aminés essentiels, des vitamines et divers composés bioactifs se produit spontanément (**Tamang, 2014**). Les concombres fermentés aigres sont faibles en calories (12 kcal). Ils contiennent également une quantité modérée de vitamine K. 100 grammes de concombre mariné aigre offrent 12 à 17 µg, soit environ 15 à 23 %, de l'apport journalier recommandé en vitamine K. Cependant, la plupart des concombres fermentés aigres sont également riches en sodium (**Behera et al., 2020**) et d'autres macromolécules notamment le Ca et Mg (**Zieliński et al., 2017**).

### **I.6. Bienfaits du concombre lactofermentés**

#### **I.6.1. Amélioration des propriétés sensorielles**

Pendant la fermentation, les BL produisent un large spectre de métabolites comme les exopolysaccharides, les composés aromatiques, les acides organiques qui donnent une saveur, un goût et une texture souhaitables au produit (**Fessard, 2017**).

#### **I .6.2. Amélioration de la digestibilité**

Les BL produisent un large spectre d'enzymes comme les  $\alpha$ -amylases, les pectinases, les phytases et les protéinases qui ont pour rôle de rendre des molécules complexes en molécules simples et vont donc assurer une digestion optimale d'une grande variété d'aliments (**Fessard, 2017**).

#### **I .6.3. Effet antioxydant**

Les antioxydants tels que le  $\beta$ -carotène, la vitamine C, la vitamine A, la lutéine aident à protéger des radicaux libres produits par différents stress biologiques et maladies (**Zieliński et al., 2017; Behera et al., 2020**). Les pickles contiennent également d'autres composés phénoliques différents comme les acides phénoliques, les flavonols, les flavanones, qui sont responsables d'une capacité antioxydante élevée. Leur présence contribue à réduire le risque de maladies causées par le stress oxydatif, comme le cancer et les troubles cardiovasculaires (**Ogrodowczyk et Drabinska, 2021**).

#### **I.6.4. Élimination des composés antinutritionnels endogènes**

La plupart des légumes contiennent des toxines et des composés antinutritionnels. Ces antinutriments comprennent les inhibiteurs d'oxalate, de protéase et d' $\alpha$ -amylase, les lectines, les tanins condensés et l'acide phytique. Les polyphénols chélatent les métaux, tels que le fer et le zinc, et réduisent l'absorption de ces nutriments, mais ils inhibent également les enzymes digestives et peuvent également précipiter les protéines. La fermentation lactique entraîne une réduction des facteurs antinutritionnels et, par conséquent, leur potentiel à améliorer l'absorption de certains nutriments (**Zieliński et al., 2017**).

#### **I.6.5. Effet probiotique**

De nombreuses études ont soutenu que le maintien d'une microflore intestinale saine offre une protection contre les troubles gastro-intestinaux y compris les infections gastro-intestinales et les maladies inflammatoires de l'intestin. Les végétaux lactofermentés grâce aux substances actives produites par les probiotique comme les acides gras à courte chaîne, les polysaccharides

visqueux et les peptides ont la capacité de prévenir la colite, agir contre la constipation et ils permettent aussi de se protéger contre les inflammations des intestins (**Guan et al., 2021**).

### I.7. Définitions du terme probiotique

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Probiotique est une expression de l'ère moderne, qui désigne « pour la vie » et sert à désigner l'association bactérienne avec des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale (**Kerry et al., 2018**). Ce sont des micro-organismes vivants non pathogènes qui présentent divers avantages pour la santé de l'hôte (**Singh et Rao., 2021**). Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (**FAO/OMS, 2001**) qui redéfinit les probiotiques comme « *des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation), confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte* ».

### I.8. Principales souches bactériennes au potentiel probiotique

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (**Ait-Belgnaoui, 2006**). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin (**Dunne et al., 2001**), connues pour ne pas présenter de risques toxique ou infectieux (GRAS) et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (**Izquierdo, 2009**). La plupart des microorganismes employés comme probiotiques sont cités dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2:** Classification des bactéries lactiques considérées comme probiotiques (**Kechagia et al., 2013**).

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autre microorganismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>		Les bactéries propioniques
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

### I.8.1. Bactéries lactiques

Les BL sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Gram-positifs, non sporulées, coques ou bâtonnets (**Bangar et al., 2022**). Elles sont généralement immobiles ne possèdent ni catalase ni oxydase, anaérobies facultatifs, dépourvues de nitrates réductase et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Belhier, 2017**). Ces bactéries sont soit homofermentaires ; produisant exclusivement de l'acide lactique, soit Hétérofermentaires ; pour celles qui produisent en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique (**Mermouri, 2018**). Selon la dernière classification, 40 genres bactériens figurent dans la liste des bactéries lactiques. Uniquement 12 genres sont applicables dans les procédés de fermentation alimentaire *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *enterococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, et *Pediococcus* (**Szutowska, 2020**).

Les BL sont généralement non pathogènes et considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (**Li et al., 2022**). Parmi les principales bactéries lactiques probiotiques utilisées on trouve :

#### *Lactobacillus*

Ce sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, avec catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Najett, 2018**). Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des carbohydrates. Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique (**Ait-Belgnaoui, 2006**). Une grande variété de lactobacilles sont utilisées comme probiotiques, parmi lesquelles *L. acidophilus*, *L. delbruekii susp. Bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus/GG* et *L. lactis* sont les espèces les plus étudiées (**Benreguieg, 2015**).

#### *Streptococcus*

Les streptocoques lactiques, sont sous forme de coque ou bacilles courts, groupés en longues chaînes, à Gram positif, avec une catalase négative, non mobile et ayant un métabolisme homofermentaire. La majorité des streptocoques sont des opportunistes pathogènes



(Mermouri, 2018). *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce des streptocoques qui soit utilisée en industrie alimentaire pour son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (Najett, 2018).

### I.8.2. Bifidobactéries

Ce sont des micro-organismes à Gram positif, non sporulés, dépourvus de flagelles, catalase négative, et anaérobies. Ils peuvent présenter des formes variées, notamment des bacilles courts et incurvés et des bacilles bifurqués (Pimentel et al., 2019). Elles sont non productrices de gaz, ayant un pourcentage de bases G+C compris entre 55 et 67%, et dont la composition de leurs peptidoglycanes est très variable. La température de croissance des bifidobactéries varie respectivement de 36 à 38°C et de 41 à 43°C et à des valeurs de pH comprises entre 6,5 à 7. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *B. lactis* et *B. longum* (Tahlaiti, 2019).

### I.9. Caractéristiques souhaitables des probiotiques

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- ✓ Être autochtone, c'est-à-dire être considéré comme une souche naturelle du tractus intestinal ;
- ✓ Non pathogène pour l'hôte ;
- ✓ Ne déclenchent pas de réaction allergique chez l'hôte ;
- ✓ Facilement cultivable à grande échelle ;
- ✓ Facile à incorporer dans l'aliment ;
- ✓ Résistance aux manipulations technologiques telles que le chauffage et les conditions d'oxygène dans les emballages ;
- ✓ Résistance aux enzymes pancréatiques, à l'acide et à la bile ;
- ✓ Capacité d'adhésion et d'attachement aux cellules épithéliales intestinales et/ou ou colonisation par la lumière ;
- ✓ Activité antagoniste aux pathogènes entériques ;
- ✓ Avantages documentés pour la santé (Pimentel et al., 2019).

Les microorganismes probiotiques doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Les probiotiques doivent être capables de survivre aux applications industrielles

et aussi être en mesure de croître ou survivre à des niveaux élevés dans le produit à la fin de la durée de conservation (**Farnworth, 2008**).

### **I.10. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques**

**I.10.1. Critères de sécurité :** qui regroupent ce qui suit :

- Historique de non pathogénicité (GRAS) ;
- Souche d'origine humaine ou alimentaire ;
- Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques ;
- Souche déposée dans une collection de culture internationale ;
- Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques ;
- Pas de déhydroxylation des sels biliaires (**FAO/ OMS, 2001**).
- 

**I.10.2. Critères technologiques :** les exigences sont les suivantes :

- Une bonne propriété sensorielle ;
- Une résistance aux phages ;
- Une viabilité durant le traitement technologique ;
- Une stabilité dans le produit et durant le stockage (**Ebel , 2012**).

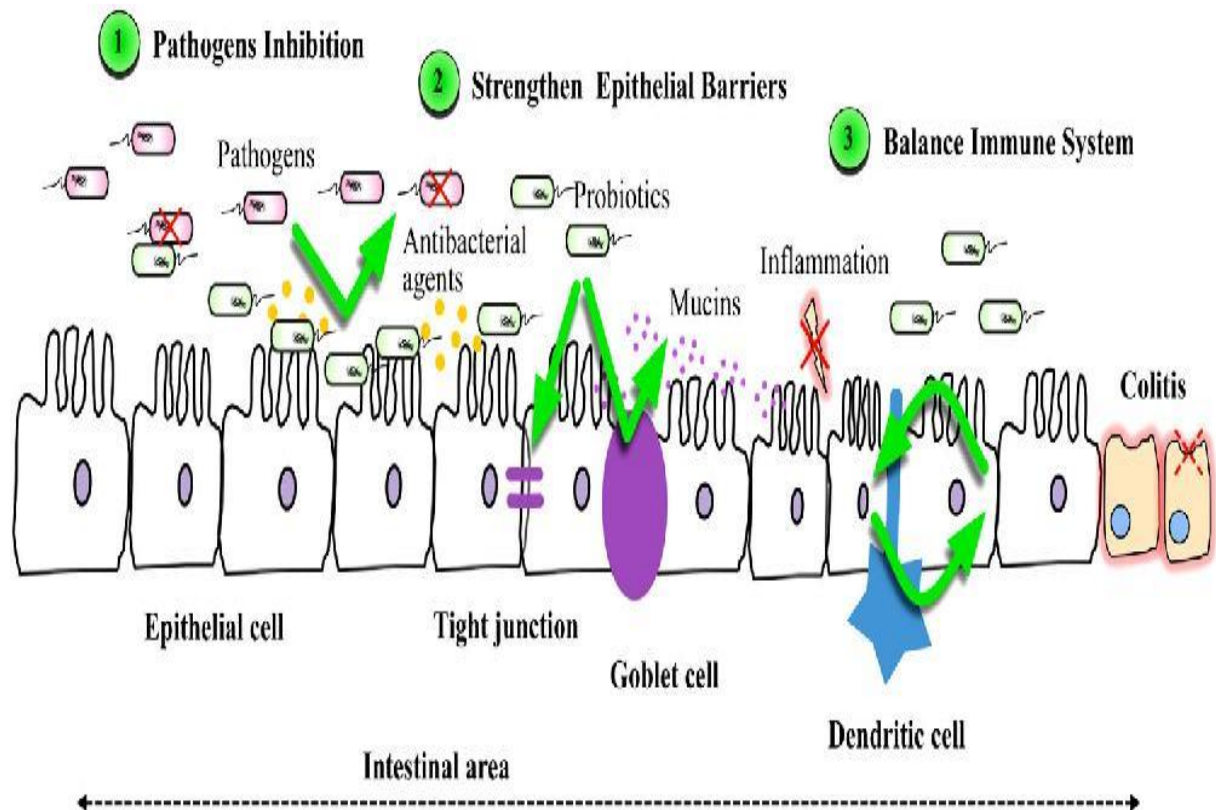
**I.10.3. Critères fonctionnels :** qui regroupent ce qui suit :

- Tolérance à l'acidité gastrique, à la bile et aux enzymes digestives ;
- Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus et persistance dans le tractus digestif ;
- Antagonisme vis-à-vis des pathogènes, production de substances ;
- Propriétés antimicrobiennes et immunomodulateur ;
- Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études *in vitro* et *in vivo* contrôlées chez l'Homme) (**Piquepaille, 2013**).

### **I.11. Modes d'action des probiotiques**

Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée ; ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité alimentaire et en stimulant l'immunité (**figure 01**). Ceci signale qu'il faut un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore

endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (Tahlaiti, 2019).



**Figure 1 :** Mécanismes d'action des probiotiques (Kim et al., 2016).

(1) Les probiotiques inhibent les pathogènes en se faisant concurrence pour la nutrition et le site de liaison, ou en sécrètent des agents antibactériens. (2) Les probiotiques améliorent la jonction serrée et favorisent la sécrétion de mucines. (3) Les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par un effet d'immunomodulation.

### I.11.1. Renforcement de fonction barrière

L'épithélium intestinal joue un rôle indispensable dans la défense et la protection du tube digestif (Groschwitz et Hogan 2009). Les probiotiques protègent le tube digestif et l'organisme de l'implantation et de la multiplication de germes pathogènes ou opportunistes grâce à un "effet barrière" qui s'exerce entre autres par un processus de compétition au niveau des récepteurs d'adhérence à la muqueuse intestinale et par la production de substances antimicrobiennes, les bactériocines (Yahla, 2017).

### I.11.2. Production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle le dioxyde de carbone et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (**Benreguieg, 2015**).

#### A- Acide lactique

Les BL produisent de l'acide lactique à partir de différentes sources de carbone, telles que les glucides simples. En outre, ils éliminent les métabolites secondaires (par exemple, les bactériocines, les exopolysaccharides et les enzymes) ce qui inhibent la croissance d'autres microorganismes (**Silva et al., 2020**).

#### B- Bactériocines

Ce sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique possédant des propriétés antibiotiques. Elles agissent principalement sur la membrane cellulaire des pathogènes : elles se fixent à certains récepteurs membranaires des bactéries, formant ainsi des pores qui rendent la membrane cytoplasmique perméable et qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et donc la mort de la bactérie affectée (**piquepaille, 2013**). Les bactériocines produites par les BL d'origine alimentaire ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur application potentielle dans la bioconservation naturelle des aliments (**Bouguerra, 2021**).

#### C. Peroxyde d'hydrogène

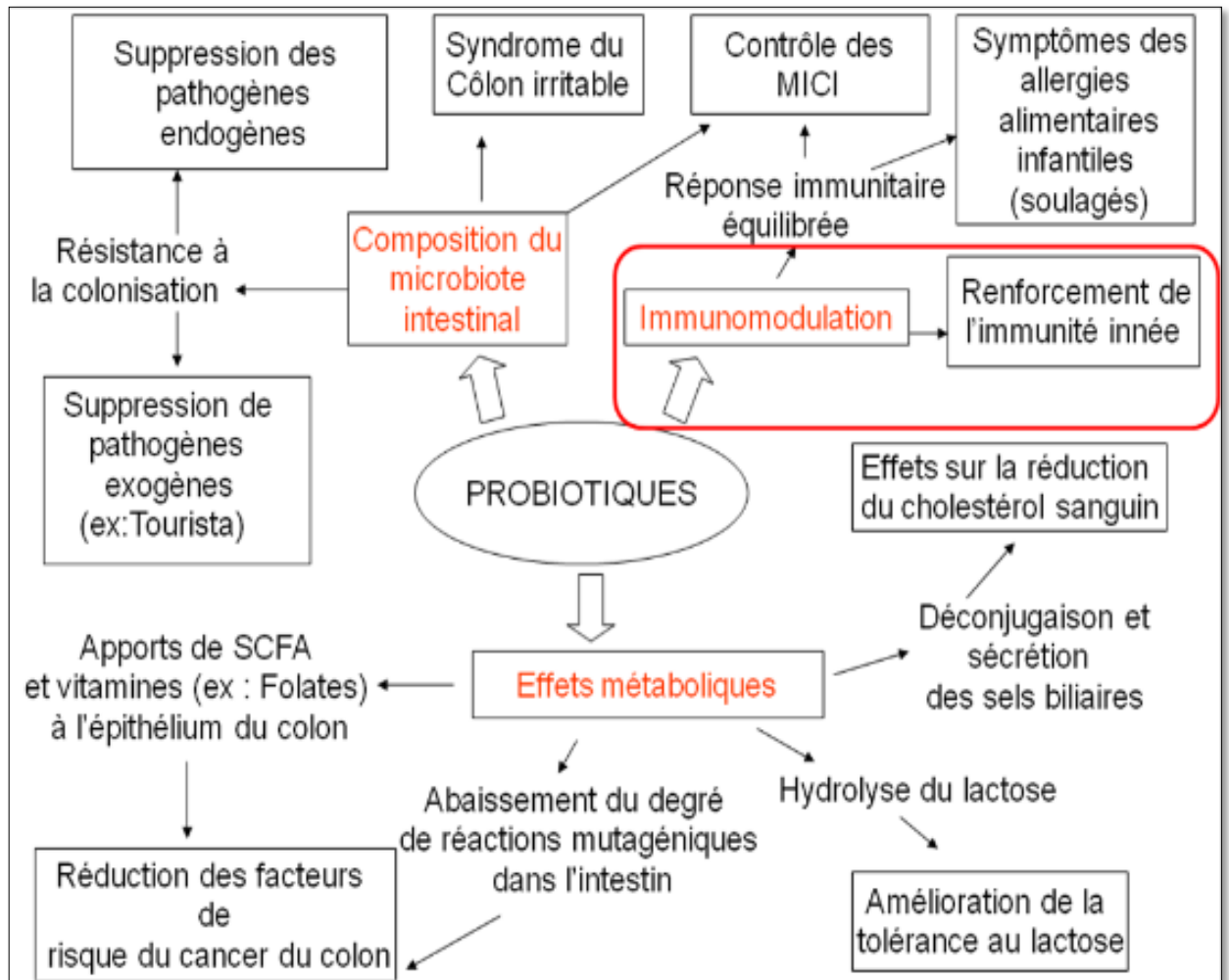
Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène. Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Khodja, 2018**).

### I.11.3. Concurrence pour l'adhésion

La première étape pour qu'une souche probiotique exerce ses effets bénéfiques est associée à la capacité d'adhérence et la colonisation des tissus de l'hôte. Ce mécanisme d'action comporte des interactions interspécifiques qui entraînent l'exclusion concurrentielle des pathogènes en bloquant les sites d'adhésion (**Rossoni et al., 2020**).

### I.12.Principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. D'innombrables avantages pour la santé sont fournis par l'ingestion des aliments contenant des cultures probiotiques (**figure 2**) (**Da Cruz et al., 2010**).



**Figure 2** : Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques (**Saarela et al., 2002**).

❖ Les principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte sont les suivants :

#### I.12.1. Soulagement de la constipation

Il y a plusieurs facteurs qui conduisent au développement de la constipation intestinale chez les individus, tels que le vieillissement, les changements dans l'alimentation, prise de médicaments, diminution de l'alimentation. L'administration de probiotiques peut améliorer la constipation en

augmentant le transit du côlon, fréquence de défécation et raidissement des selles (**Pimentel et al., 2019**).

### **I.12.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme**

Quelques souches de bactéries lactiques, telles que *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* et d'autres lactobacilles dans les produits fermentés, peuvent soulager les symptômes de l'intolérance au lactose en fournissant de la lactase bactérienne à l'intestin et à l'estomac. Étant donné que l'intolérance au lactose touche près de 70 % de la population mondiale, la consommation des aliments et produits probiotiques est essentielle (**Singh et al., 2011**).

### **I.12.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées**

Des études cliniques ont démontré que la diarrhée du voyageur, diarrhée aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (**Wang et al., 2004**). Les souches *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus reuteri*, et *Bifidobacterium sp* sont utilisées pour le traitement des diarrhées en empêchant les virus et les bactéries pathogènes de se lier aux cellules épithéliales (**Amara et Shibl, 2015**).

### **I.12.4. Réduction du taux de cholestérol sanguin**

Les microorganismes probiotiques, comme la bifidobactérie, ont des propriétés bénéfiques pour contrôler le taux de cholestérol sanguin. L'utilisation de probiotiques peut entraîner une diminution importante du taux de cholestérol total en réduisant le taux de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (LDL), tandis que le taux de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL) augmente légèrement (**Pimentel et al., 2019**).



# **Partie expérimentale**

### II.1. Processus de préparation du concombre lactofermenté

Un kilogramme de concombre a été acheté auprès du marché local de la commune de Jijel afin de préparer du concombre lactofermenté (pickles). Pour se faire nous avons suivi les étapes suivantes :

-Commencez par porter un volume de 500 ml d'eau à ébullition dans une casserole et réservez jusqu'à refroidissement intégral.

-Durant ce temps, lavez soigneusement les concombres, les épluchés, puis séchez-les avec un torchon propre. Puis à l'aide d'un couteau à légumes, tranchez-les en 4 morceaux, puis en lamelles.

-Déposez une première portion dans un pot à conserve, salez et poivrez.

-Posez un autre morceau de concombre par-dessus et continuez de la même manière jusqu'à arriver en haut, en terminant par plonger une feuille de vigne.

-Appuyez bien au sommet avec un ustensile plat en bois pour comprimer le tout, versez de l'eau refroidie à hauteur et clipsez le pot.

- Laissez macérer 2 jours dans une pièce à température ambiante pour commencer la lactofermentation qui se traduira par l'apparition d'un trouble et des bulles de gaz puis entreposez dans un autre endroit bien frais.

### II.2. Analyse physicochimique

#### II.2.1. pH et acidité titrable

Le pH a été déterminé en utilisant un pH-mètre préalablement étalonné par des solutions tampons pH4 et pH7. Les pickles de concombre ont été coupés en petits morceaux à environ 1 cm× 1 cm, puis hachés dans un hachoir. Une aliquote de 20 g a été mélangée avec 20 ml d'eau distillée. Par la suite, l'électrode a été trempée dans le mélange et la valeur du pH a été lue à 25°C (Gezginç and İnanç, 2021).

Pour la détermination de l'acidité titrable, 10 ml du broyat de pickles de concombre ont été placés dans un Erlenmeyer de 50 ml, puis titrer par une solution de NaOH 0.01mol/l en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine (0.1g/ml) comme indicateur jusqu'à ce que le pH atteigne 8.2. L'acidité titrable est exprimée en ml d'acide lactique/100g selon la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$\text{Acidité titrable (acide lactique)} = V N_{\text{NaOH}} \times 10 / V_{\text{échantillon}}$$



### II.2.2. Teneur en humidité

Pour la détermination de la teneur en humidité, 10 g de l'échantillon broyé ont été pesés dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset a été ensuite mis à l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le pourcentage en humidité est obtenu par l'application de la relation suivante (AOAC, 1990) :

$$\text{Humidité (\%)} = (P1-P2) / P1.100$$

Avec :

**P1** : Poids de l'échantillon humide;

**P2** : Poids de l'échantillon séché.

### II.2.3. Teneur en minéraux

1 g d'échantillon de concombre broyé a été placé dans un creuset déjà séché et taré. Le creuset a été placé dans un four à moufle réglé à 550°C pendant 30 min. Le creuset été refroidi pendant 30 min ; ensuite il a été pesé jusqu'aux deux dernières différences de poids étaient à moins de 0,5 mg. La teneur en cendres est exprimée par la formule suivante (Standard GB/T5009.4-2003) :

$$\text{Matière minérale\%} = (P1/P2).100$$

Avec :

**P1** : Poids des cendres (g);

**P2** : Poids initial de l'échantillon (g).

### II.2.4. Détermination de la teneur en protéines

La mesure de la teneur en protéines du concombre a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 2000) :

- **Etape de la minéralisation**

Dans un matras de Kjeldahl, nous avons introduit 1g de concombre déjà broyée, 2 g de catalyseur (mélange de sulfate de cuivre et sulfate de potassium), et 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 97% puis nous avons chauffé le matras jusqu'à ce que la couleur noire se transforme en une couleur limpide. Ensuite nous avons procédé à un refroidissement du matras et l'échantillon minéralisé a été transvasé dans une fiole. Le matras a été lavé avec de l'eau distillé tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.

- **Etape de Distillation**

Dans un matras, nous avons introduit 10g du contenu de la fiole puis nous avons ajouté 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude à 25%. En parallèle, nous avons préparé une solution d'acide borique à 0.1N avec 10 gouttes d'indicateur de Tashiro (couleur rose violette en milieu acide et verte dans le milieu alcalin). La distillation est arrêtée après le changement de couleur en vert.

- **Étape de titration**

Nous avons titré l'excès des anions de borate avec l'HCl à 0.1N jusqu'au changement de la couleur vert en rose violet. Le pourcentage en azote total est calculé par la formule suivante :

$$N \% = (V_E - V_B) \times 1.4 \times N/M$$

**Avec :**

**VB :** Volume de HCl 0.1N utilisé pour essai blanc (ml);

**VE :** Volume HCl 0.1N utilisé pour la titration de la solution à doser (ml);

**100 :** Coefficient du pourcentage;

**10 :** Coefficient du volume total de la solution à doser;

**M :** Masse de la prise d'essai.

Le taux d'azote total est converti en taux de protéines brutes selon la formule suivante :

$$\text{Taux de protéines brutes (\%)} = N \text{ total (\%)} \times 6.25$$

### **II.3. Analyse microbiologique du concombre lactofermenté**

#### **II.3.1. Préparation de la solution mère**

Pour la préparation de la solution mère et des dilutions décimales, une prise d'essai de 10g de concombre lactofermenté a été hachée dans un mélangeur. Pour préparer la solution mère ( $10^{-1}$ ), nous avons dilué 10g du concombre lactofermenté dans 90 ml d'eau péptonné stérile (EPS). La dilution  $10^{-2}$  a été préparée à partir de 1 ml de la solution mère, ajouté aseptiquement à 9 ml d'EPS. De la même manière, les dilutions ont été poussées jusqu'à  $10^{-6}$  (Aljahani, 2020).

#### **II.3.2. Dénombrement de la flore totale aérobies mésophiles**

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile a été effectué sur le milieu gélosé PCA. Un ml de chaque dilution a été étalé en surface de la gélose PCA coulée et solidifiée. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h, les colonies blanchâtres et de forme circulaire ont été dénombrées (ISO 4833-:2013).

### II.3.3. Dénombrement des levures et moisissures

Le dénombrement des levures et moisissures a été effectués sur le milieu gélosé OGA. 0.1 ml de chaque dilution a été étalé en surface de la gélose OGA coulée et solidifiée. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72h. Dénombrer les colonies de levures de couleurs blanches, mates avec un diamètre de 1-2mm (Aljahani, 2020).

### II.3.4. Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué sur le milieu gélosé de Man-Rogosa-Sharp (MRS). L'ensemencement a été fait par la méthode d'ensemencement en surface. 1 ml de chaque dilution a été étalé en surface de la gélose MRS coulée et solidifiée. Les boîtes ont été incubées en aérobiose à 30°C pendant 48h. Les colonies à dénombrer sont de petites tailles, de couleurs blanchâtres et brillantes à pourtours réguliers, elles peuvent apparaître en forme circulaire ou lenticulaire (Barbu, 2008).

### II.4. Isolement et pré-identification des bactéries lactiques

Pour l'isolement des bactéries lactiques, nous avons préparé une solution mère à partir d'une pesée de 10g du concombre lactofermenté broyé et diluer dans 90 ml de tampon salin (0.85%) de NaCl. Des dilutions ont été réalisées jusqu'à  $10^{-5}$  puis la gélose MRS coulée et solidifiée a été ensemencée en surface par 0.1ml de chaque dilution suivie d'une incubation à 30 °C pendant 48 à 72h. Après incubation, des colonies montrant différentes morphologies ont été prélevés et purifier par des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS afin d'obtenir des colonies pures. Les colonies sélectionnées ont été testées pour leur morphologie, la coloration de Gram, et la catalase (Idoui et Karam, 2008).

Après **examen macroscopique** des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écarter tout ce qui ne peut être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif (en violet) de celles à Gram négatif (en rose), les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

La **catalase** a été mise en évidence en émulsionnant la culture lactique à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

La recherche de l'**arginine dihydrolase (ADH)** est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Môeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du

milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

Le test de la **croissance aux différentes températures** est important, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures lactiques pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 37°C et 45°C. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par un examen des différents milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

### II.5. Conservation des isolats

La conservation des bactéries lactiques était réalisée par deux méthodes, une conservation à courte durée et une autre à longue durée selon la méthode suivante :

- **Conservation à courte durée** : Les souches sontensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 37 °C pendant 18 h, les tubes sont conservés à + 4°C.
- **Conservation à longue durée** : A partir des jeunes cultures (18 h-24h), les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 tr / 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le glycérol pur (50%) et le lait écrémé stérile (30%) ont été ajouté. Les cultures lactiques sont conservées à -20°C.

### II.6. Étude de quelques propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées du concombre lactofermenté

#### II.6.1. Résistance aux sels biliaires

La méthode utilisée pour réaliser ce test est celle décrite par **Kaewnopparat et al. (2013)**. Avant de réaliser ce test, une étape de récupération de culot bactérien a été effectué par une centrifugation à 5000 rpm/10min de la culture jeune, suivie de deux lavage par le PBS. Le culot bactérien final est suspendu dans un volume du même tampon (PBS), puis un volume de 1 ml des cellules bactériennes préparées est mis dans deux tubes à essais contenant 6ml du bouillon MRS, le premier additionné de 0.3% de sels biliaires, et le deuxièmes sans sels dont il est considéré comme témoin, le tout est incubé à 37°C pendant 4h. La résistance de BL aux sels biliaires a été estimée par une mesure de la densité optique à 620 nm.

Le taux de la survie des BL a été déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de survie } [DO_2 / DO_1] \times 100$$

Avec :

DO<sub>1</sub>: la densité optique du témoin.

DO<sub>2</sub>: la densité optique de tube à 0.3% sels.

### II.6.2. Résistance au pH gastrique

L'évaluation de la capacité à survivre dans un milieu hostile a été faite par application de la méthode décrite par **Kaewnopparat et al. (2013)**.

Le bouillon MRS a été préparé aux différents pH (pH<sub>2</sub>, pH<sub>3</sub>, pH<sub>4</sub> et pH<sub>5.8</sub>). Dix ml de chaque bouillon ont été introduit dans des tubes stériles dont chaque tube reçoit 1 ml de la culture jeune. Le tout est incubé à 37°C pendant 4h.

Le taux de la survie a été déterminé par la mesure de la densité optique à 620 nm en appliquant l'équation suivante :

$$\% \text{ survie} = \text{DO}_{\text{MRS ajusté (pH 2,3,4)}} / \text{DO}_{\text{MRS à pH 5.8}} \times 100$$

### II.6.3. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation

Pour les tests d'auto-agrégation et co-agrégation, la méthode décrite par **Dias (2013)** a été utilisée. Pour l'**auto-agrégation**, un volume des cellules bactériennes de la culture jeune a été lavé deux fois avec du PBS puis mis en suspension dans 4 ml du même tampon, un vortex de 10 s a été procédé, ensuite après incubation de la suspension à 37°C pendant 4 h, l'absorbance est déterminée à une longueur d'onde de 620 nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé en fonction du temps jusqu'à ce qu'il soit constant en utilisant la formule suivante :

$$\text{Auto-agrégation \%} = 1 - (A_t / A_0) \times 100$$

Avec:

**A<sub>t</sub>**: DO à t heures d'incubation.

**A<sub>0</sub>**: DO à t<sub>0</sub>.

Pour la **co-agrégation**, la suspension cellulaire de nos BL a été préparée de la même manière que le test d'auto-agrégation. Les suspensions bactériennes de *E.coli* et *S.aureus*, *P.aeruginosa* ont été préparées sur bouillon LB, pour chaque souche, une colonie est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile etensemencée dans des tubes stériles contenant le bouillon LB, ensuite les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 h pour obtenir les cultures bactériennes à utiliser.

Une fois, les suspensions préparées, dans des tubes stériles 2 ml de la suspension lactique a été additionné à 2 ml de la suspension pathogène suivi d'un vortex de 10 s. Après une incubation de 4 h à une température de 37°C, la DO est mesurée à 620 nm.

Le pourcentage de co-agrégation est mesuré en utilisant la formule suivante:

$$\text{Co-agrégation (\%)} = [(A_{\text{lactobacillus}} + A_{\text{pathogène}}) - A_{\text{mix}} \times 100] / (A_{\text{lactobacillus}} + A_{\text{pathogène}})$$

### II.2.6.4. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Bouridane et al. (2016)**: Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm/5min suivie de deux lavages successifs par le PBS puis résuspendu dans 1.2 ml de tampon urée phosphate magnésium (pH=7.1). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1.0 à 450nm (DO initiale).

Ensuite 0.6 ml du xylène, chloroforme ont été ajoutés séparément et soigneusement à 3ml de la suspension bactérienne obtenue puis incubées à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2min. Après 15 min d'incubation à la température ambiante, la phase aqueuse a été récupérée, ensuite la densité optique finale a été mesurée à 450nm (DO finale).

La différence de la densité optique est considérée comme le pourcentage de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) déterminée par l'équation suivante:

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = [DO_{\text{initiale}} - DO_{\text{finale}} / DO_{\text{initiale}}] \times 100$$

### II.6.5. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Dans le but d'évaluer la capacité de nos BL à adhérer à l'épithélium intestinal, la méthode décrite par **Lin et al. (2007)** qui comporte les trois étapes suivantes a été appliquée:

*Préparation des cellules épithéliales*: Un segment de l'iléum d'un poulet de chair est bien nettoyé et rincé par le tampon phosphate saline stérile (PBS pH 7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30 min pour être bien lavé. Ensuite, les tissus ont été repris, lavées 10 fois avec le PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10<sup>-4</sup>. Cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'est pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5x10<sup>4</sup> cellules/ml.

*Préparation des cellules bactériennes*: les cellules bactériennes jeunes ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm/10min. Le culot a été repris dans 2 ml du PBS suivis d'une

observation microscopique (x 100) pour confirmer que le nombre est approximativement de  $10^8$  cellule/ml.

*Réalisation du test:* 1ml de la culture a été mélangé avec 1 ml de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 40 min, un frottis est réalisé, la coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.



# **Résultats et discussion**



#### III.1. Caractéristiques physicochimiques du concombre lactofermenté

Les valeurs de pH, de l'acidité titrable, du taux d'humidité, des cendres et des protéines sont enregistrées sur le **tableau 3**.

D'après le tableau 3, notre échantillon du concombre lactofermenté a enregistré une valeur de pH de  $3.54 \pm 0.21$  après 15 jours de fermentation. De même l'étude d' **Ahmed et al. (2021)** sur le concombre lactofermenté a signalé une valeur de pH similaire à celle de notre échantillon après 18 jours de fermentation.

Les travaux de **De Matos et al. (2019)** sur le concombre mariné au verjus comme nouvel agent acidifiant a enregistré une valeur de pH se situant dans la plage de 3,30 - 4,02. Pendant la fermentation les bactéries lactiques utilisent les sucres comme nutriment pour produire l'acide lactiques ce qui entraîne une diminution du pH des produits alimentaires, la conservation de ces produits sera efficace avec un enivrement très acide anaérobie, riche en sel et sans sucre, car la majorité des bactéries sont incapables de se développer dans ces conditions (**Akhtar et al., 2021 ; Al-Shawi et Alneamah., 2021**).

La valeur enregistrée pour l'acidité titrable été de  $0.92 \pm 0.25$  (ml d'acide lactique/100g). **Korus et al. (2021)** ont travaillé sur différents types de kimchi, ils ont trouvé que l'acidité du kimchi du type concombres moulus avec la peau était de  $1.40 \pm 0.05$  (ml d'acide lactique/100g) et celle du Kimchi du type Radis Blanc était de  $1.62 \pm 0.05$  (ml d'acide lactique/100g). D'autres parts, d'après les résultats de l'étude menée par **Gezginç et İnanç (2021)** l'acidité titrable des cornichons lactofermentés après 21 jours était comprise entre  $0.54 \pm 0.1$  et  $1.0 \pm 0.28$  (ml d'acide lactique/100g).

La teneur en protéines de notre échantillon était de 0.615%. Selon **Kim et al. (2008)** la teneur en protéine de kimchi est de 2,2 g. D'autre par les travaux de **Sultana et al. (2014)** sur des végétaux fermentés ont signalé une teneur en protéines de 2.25% pour les carottes, 2.3 % pour le piment vert, et de 2.1% pour les aubergines.

En outre, notre échantillon du concombre lactofermenté a enregistré une teneur en humidité de  $92.24 \pm 0.54\%$ . La teneur en humidité des carottes, des piments vert et d'aubergines lactofermentés était de 83.4, 81.3 et 87.58% respectivement (**Sultana et al., 2014**). De même, **Kim et al. (2008)** ont montré que le kimchi lactofermenté à long terme possédé une humidité de 88.5 %.

Nos résultats de la teneur en cendres ( $1.25 \pm 0.34$  %) se rapprochent de ceux trouvés par **Kim et al. (2008)** avec une valeur de 2.57 %.

**Tableau 3 :** Caractéristiques physicochimiques du concombre lactofermenté.

Échantillon	pH	Acidité titrable (ml d'acide lactique/100g)	Humidité (%)	Cendre (%)	Protéines (%)
Concombre lactofermenté	$3.54 \pm 0.21$	$0.92 \pm 0.25$	$92.24 \pm 0.54$	$1.25 \pm 0.34$	0.615

### III.2. Caractéristiques microbiologiques du concombre lactofermenté

#### III.2.1. Microflores du concombre lactofermenté, isolement et pré-identification des bactéries lactiques

Les résultats relatifs aux dénombrements sont rapportés dans le **tableau 4**. Le nombre des levures était de  $2 \times 10^3$  log UFC / g et celui de la FTAM de  $1 \times 10^5$  log UFC / g. Le dénombrement de la microflore lactique a donné un nombre de  $4 \times 10^9$  log UFC/g de concombre lactofermenté. À partir de cette flore lactique, nous avons sélectionné 7 isolats au hasard. Ces derniers ont été purifiés et pré-identifiés.

**Tableau 4 :** Microflores dénombrées dans le concombre lactofermenté.

Les microflores	Nombre (log UFC / g)
Bactéries lactiques	$4 \times 10^9$
Levures	$2 \times 10^3$
FTAM	$1 \times 10^5$

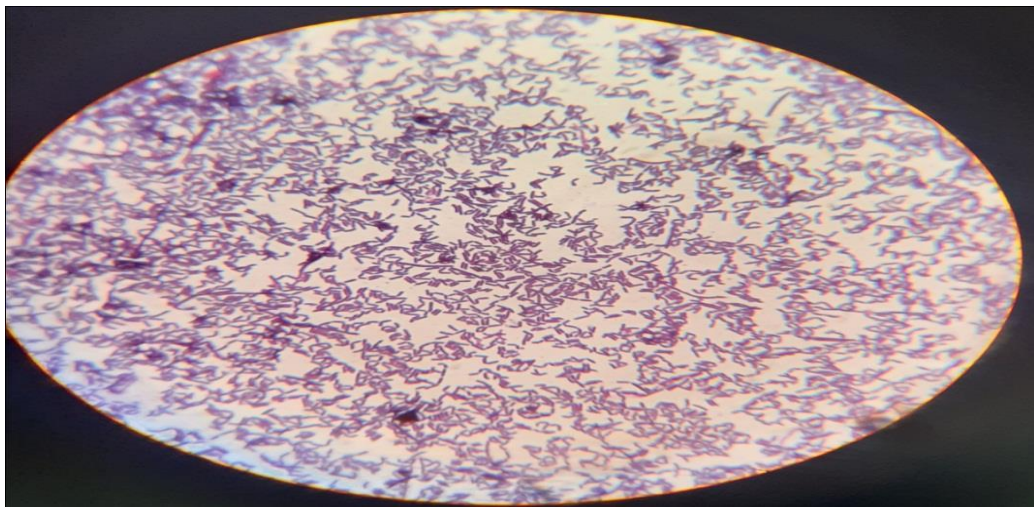
Sur gélose, les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre **figure 3**. L'examen microscopique a révélé deux formes de cellules qui sont la forme bacille et cocci.

Les isolats se sont avérés Gram positif **figure 4** et catalase négative ce qui caractérise les bactéries lactiques. La croissance à différentes températures nous a permis de noter que certaines

bactéries lactiques isolées sont des mésophiles, puisqu'elles se développent bien à 37 °C et 10 °C. Toutes les bactéries (100 %) étaient ADH négative, ce qui explique leur incapacité à décomposer l'arginine et libérer l'ammoniac par le système de l'arginine dihydrolase (**tableau 5**).



**Figure 3:** Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur gélose MRS.



**Figure 4:** Aspect microscopique des bactéries lactiques après coloration de Gram (x100).

Les bactéries lactiques sont les espèces bactériennes les plus fréquemment présentes dans les légumes lactofermenté dont les cornichons, le concombre et les carottes (**Hartanto et Fevria, 2020**).

De même **Chen et al. (2012)** ont indiqué que *L. plantarum* a fréquemment été isolé du concombre naturellement fermenté et cru, et qu'elle est proposée comme culture starter pour la fermentation du concombre. D'autre part *L. plantarum* a été identifié comme l'une des BL les plus abondements trouvés dans plusieurs légumes fermentés taïwanais tels que les pousses de bambou fermentées (jiang-sun), les concombres fermentés (jiang-gua), les tiges de brocoli de concombre fermentées (Yan-Tsai- tibia) et cummingcordia fermenté (pobuzihi) (**Chen et al., 2016**).

**Tableau 5** : Caractéristiques biochimiques des bactéries lactiques isolées du concombre lactofermenté.

Bactéries	Forme	Gram	Catalase	ADH	Croissance aux temperatures		
					10 °C	37 °C	45 °C
<b>Lactiques</b>							
<b>Lb1</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb2</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb3</b>	<b>cocci</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb4</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb5</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb6</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-
<b>Lb7</b>	<b>bacille</b>	+	-	-	+	+	-

### III.2.2. Quelques aptitudes probiotiques des BL sélectionnées

#### III.2.2.1. Test d'auto/ Co-agrégation

De nombreuses études ont confirmé que l'auto-agrégation est une propriété importante des souches probiotiques pour la prévention des pathogènes, c'est un phénomène lié à la formation

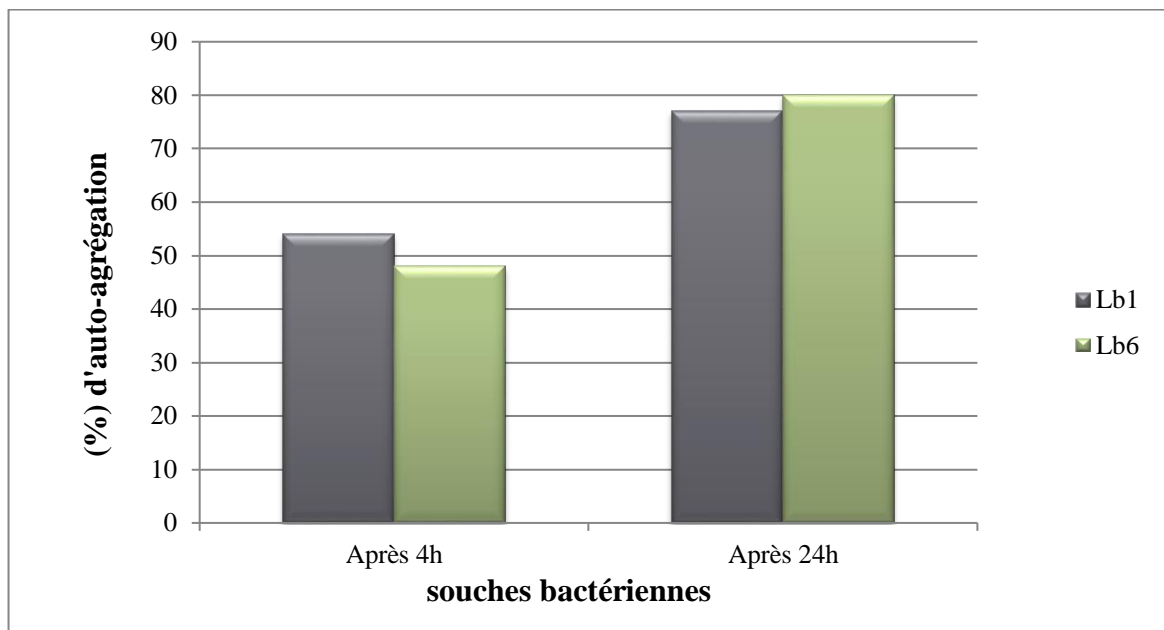
de biofilm (**Anandharaj et al., 2015**). Les résultats d'auto-agrégation des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 sont illustrés par la **figure 5**.

D'après la figure 3, nous remarquons que le pourcentage d'auto-agrégation des deux bactéries lactiques Lb1 et Lb6 isolées du concombre lactofermenté était de 54% et 48% respectivement après 4h d'incubation à 37°C. Cependant, ce dernier a atteint des valeurs élevées (77% et 80% respectivement) après 24h d'incubation à 37°C. Nos résultats sont meilleurs que ceux trouvés par **Nivoliez et al. (2015)** qui ont démontré que le pourcentage d'auto-agrégation de *L. rhamnosus* Lcr35 était compris entre (16% -31%) et entre (12% -21%) après 3h et 5h d'incubation à 37°C respectivement.

D'autre part nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Khalil et al. (2018)** qui ont montré que *Lactobacillus sp* isolée des aliments fermentés traditionnels possède un pourcentage d'auto-agrégation compris entre 33.63% et 50% après 5h d'incubation à 37°C. Cependant, les résultats de **Liu et al. (2021)** sont plus importants que les nôtres, en atteignant une valeur de 75.98% pour *L. brevis* et 86.12% pour *L. plantarum* après 6h d'incubation à 37°C.

Selon **Khalil et al. (2018)**, la capacité d'auto-agrégation des bactéries lactiques est classée comme bonne si le pourcentage est supérieur à 40% et faible si elle est inférieure à 10%. D'après l'étude de **Zeng et al. (2020)**, une forte auto-agrégation montre une surface hydrophobe, tandis qu'une faible auto-agrégation est due à une surface hydrophile. Sur la base des résultats obtenus, on déduit que les surfaces de Lb1 et Lb6 sont hydrophobes.

**Çelik et Çelebioğlu (2021)** ont signalé que l'auto-agrégation est la capacité des bactéries à s'assembler entre elles, et permet de lier des bactéries probiotiques avec la muqueuse intestinale humaine, c'est pourquoi une forte agrégation confirme une bonne adhésion à la muqueuse intestinale qui est influencée par plusieurs facteurs comme les protéines de la couche superficielle des bactéries, les polysaccharides extracellulaires et l'acide lipotéichoïque. Selon **Luang-In et al. (2021)**, une haute capacité d'agrégation peut être classée comme un bon indicateur d'adhésion qui permet de former des liaisons entre des bactéries probiotiques en empêchant la colonisation des agents pathogènes dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte.



**Figure 5** : Pourcentage d'auto-agrégation des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 isolées du concombre lactofermenté.

La co-agrégation est avantageuse car elle permet de produire des substances antimicrobiennes à proximité de plusieurs cellules pathogènes, les éliminant ainsi efficacement du tube digestif (Ahmed et al., 2021).

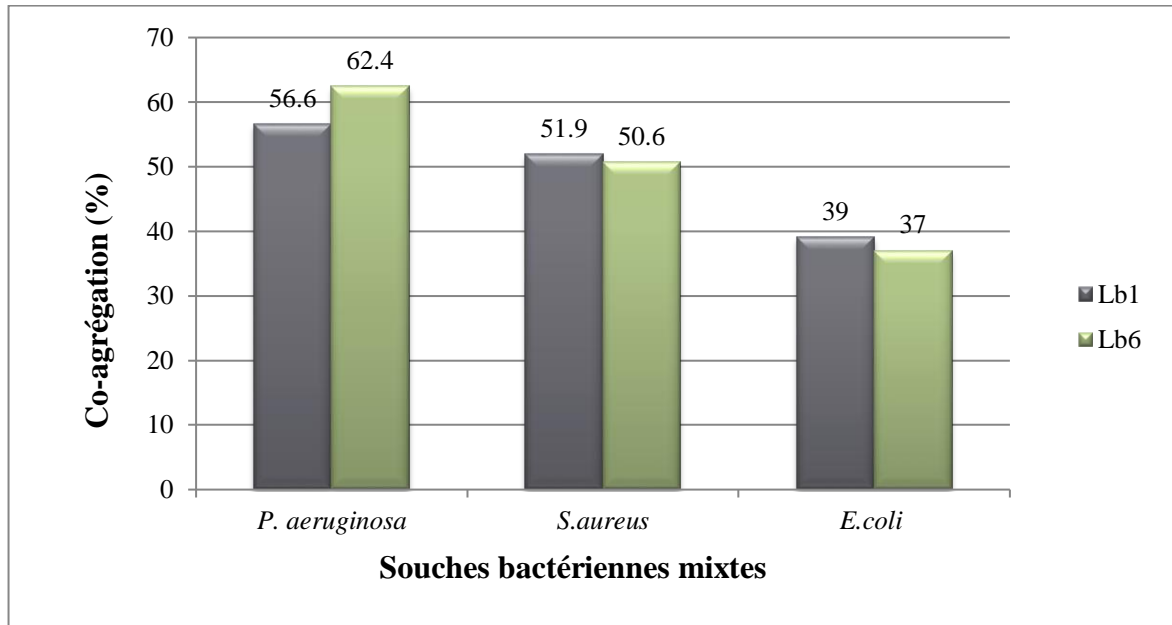
Le test de co-agrégation a été réalisé entre nos deux bactéries lactiques Lb1, Lb6 et les trois souches pathogènes *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* après 4h d'incubation. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 6.

À partir de la figure 4, nous avons remarqué une bonne co-agrégation de Lb1 et Lb6 avec les trois espèces pathogènes *P. aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli* où les valeurs enregistrées pour Lb1 étaient de 56.6%, 51.9% et 39% ; et les valeurs enregistrées pour Lb6 étaient de 62.4%, 50.6% et 37% respectivement.

Selon l'étude de Khalil et al. (2018), le pourcentage de co-agrégation de *Lactobacillus sp* est proche de notre résultat et il varie entre : 50.05% et 63.94% pour *P. aeruginosa*, 22.94% - 36.54% pour *E. coli*, cependant il est moins important pour *S. aureus* (22.10% - 40.15%). Une autre étude menée par Liu et al. (2021) sur *Lactobacillus sp* isolé des pickles a montré aussi une faible capacité de co-agrégation avec *E. coli* qui est égale à 28.19%. En 2021, Ahmed et ses collaborateurs ont enregistré une co-agrégation des souches de *Lactiplantibacillus plantarum*

NPL1284 et *Pediococcus pentosaceus* NPL1264 isolées du concombre fermenté qui est égale à 63 %

avec *P. aeruginosa*. En outre *Lactiplantibacillus plantarum* NPL 1279 isolée du même produit a enregistré une coagrégation de 54% avec *E.coli*.



**Figure 6:** Pourcentages de coagrégation des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 avec *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

### III.2.2.2. Test d'hydrophobicité

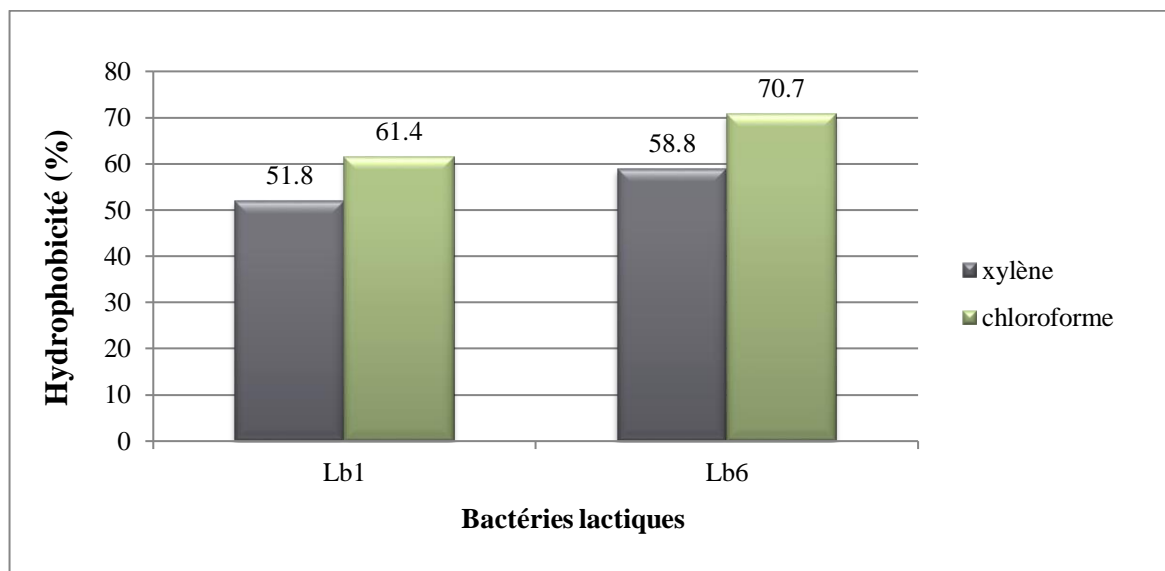
L'hydrophobicité de la surface bactérienne est une caractéristique importante pour maintenir les bactéries dans le tractus gastro-intestinal. Cette caractéristique est l'un des paramètres qui peuvent permettre l'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse (**Çelik et Çelebioğlu, 2021**). Selon **Luang-In et al. (2021)**, l'hydrophobicité de la surface cellulaire est liée à l'adhérence microbienne aux hydrocarbures.

Dans notre étude, nous avons évalué l'hydrophobicité des deux lactobacilles Lb1 et Lb6 vis-à-vis du xylène et du chloroforme. Le xylène reflète l'hydrophobicité de la surface cellulaire alors que le chloroforme est un solvant acide monopolaire (**Melgar-Lalanne et al., 2013**).

D'après les résultats présentés dans la **figure7**, le pourcentage d'hydrophobicité obtenu pour Lb1 et Lb6 en présence du xylène était de 51.8 % et 58.8% respectivement. Donc on déduit que la surface de ces souches est hydrophobe. D'autre part, le pourcentage d'hydrophobicité enregistré pour les deux lactobacilles était élevé en présence du chloroforme (Lb1 : 61.4% et Lb6 : 70.7%) ce qui signifie que la surface de Lb1 et Lb6 est de caractère acide.



**Nivolies et al. (2015)** ont montré que *L. rhamnosus* Lcr35® avait une forte affinité au chloroforme 60.41 %. Par ailleurs **Ahmed et al. (2021)** ont trouvé un pourcentage d'hydrophobicité au xylène égale à 54% avec *Lactiplantibacillus plantarum* NPL1258. D'autre part les résultats obtenus par **Handa et sharma (2016)** sont moins importants que les nôtres, ou le pourcentage d'hydrophobicité au chloroforme était de 9%, alors que le pourcentage au xylène était de 50,8%. D'après **Liu et al. (2022)** la capacité d'adhésion des souches lactiques isolées des pickles au chloroforme est comprise entre (20.95 - 90.09%) pour *L. plantarum* et (41.87-98.03%) pour *L brevis*. **Ekmekci et al. (2009)** ont indiqué que l'hydrophobicité des lactobacilles est considérée comme faible si le pourcentage d'affinité est entre 0-35%, modéré entre 36-70% et forte entre 71-100%. Sur la base des résultats obtenus, on déduit que les surfaces de Lb1 et Lb6 sont hydrophobes.



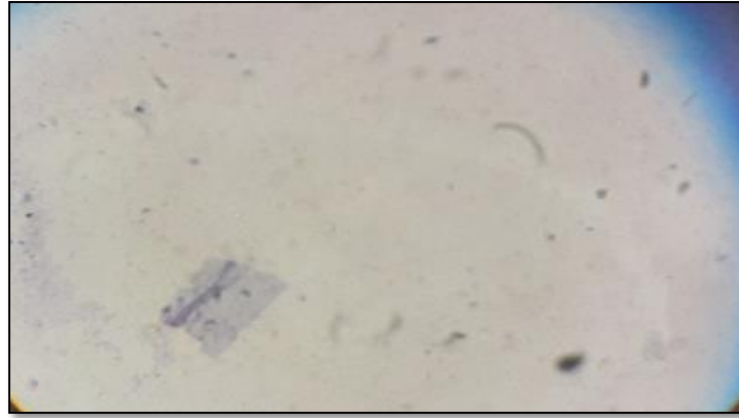
**Figure 7:** Pourcentage d'hydrophobicité des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 isolées du concombre lactofermenté.

### III.2.2.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Les probiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en inhibant la colonisation des agents pathogènes et en améliorant la cicatrisation des muqueuses lors de l'adhésion à l'épithélium intestinal (**Jeong et al., 2021**).

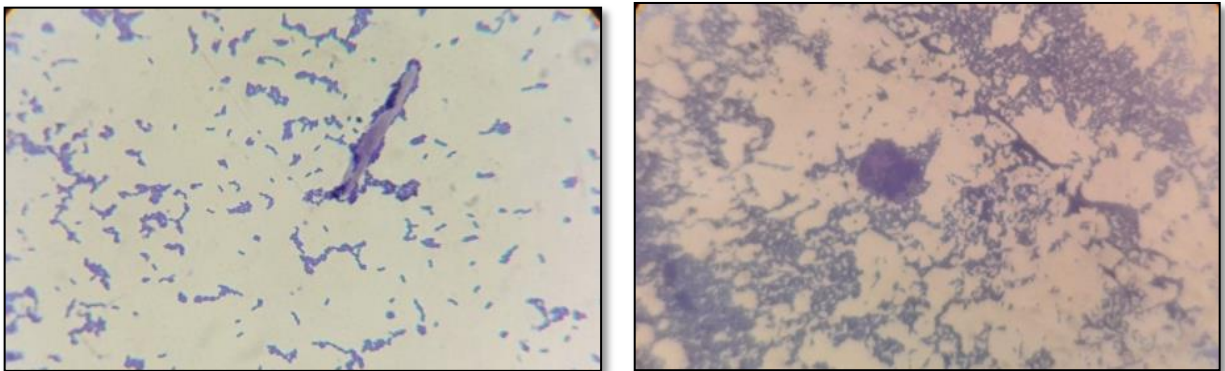
Un test de confirmation est réalisé pour vérifier l'efficacité des lavages et confirmer la pureté de nos cellules, avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales. La **figure 8** montre que le tissu est dépourvu de contaminants.





**Figure 8:** Photomicrographie de Cellules épithéliales saines.

L'adhésion a été réalisée à l'aide des cellules épithéliales d'origine animale (tissus de poulet). La **figure 9** montre que le nombre de cellules des deux bactéries lactiques Lb1 et Lb6 adhérentes aux cellules épithéliales.



**Figure 9 :** Photomicrographie d'adhésion des bactéries lactiques Lb1 (a) et Lb6 (b) aux cellules épithéliales.

Diverses études ont montré qu'il y'a une relation entre la capacité d'agrégation et d'adhésion (**Simões et al., 2022**). Selon nos résultats, Lb1 et Lb6 avaient de bonnes capacités d'adhésion dans les cellules épithéliales et de bonnes propriétés d'auto-agrégation ; ainsi, cette corrélation entre adhésion et auto-agrégation a été confirmée dans notre étude.

Des travaux ont été réalisés sur cette aptitude probiotique. L'étude réalisée par **Liu et al. (2021)** sur le potentiel probiotique des souches de lactobacilles isolées à partir de légumes fermentés à révéler que la capacité d'adhésion variait significativement entre les *L. plantarum* testés, avec un taux d'adhésion allant de 2,42 à 34,52 %. Cependant, *L. brevis* a montré une capacité d'adhésion variant entre 1,98 - 8,53 %. Par ailleurs l'étude menée par **Lee et al. (2016)**, sur le potentiel

probiotique des bactéries lactiques de kimchi, a montré que que *L. plantarum* C182 est dotée d'une faible capacité d'adhésion ( $1,2 \pm 0,4$  UFC/cellule).

Selon **Simões et al. (2022)**, le pourcentage d'adhésion de *L. paracasei* CCMA1771 et *L. brevis* CCMA1762 isolées des olives de table fermentées était de  $1,84 \pm 1,2$  %,  $8,47 \pm 4,26$  % respectivement. **Gao et Li (2018)** ont trouvé que les taux d'adhérence étaient de  $29,6 \pm 0,6$  % pour la souche *Enterococcus faecalis* L2-73 et de  $23,8 \pm 1,2$  % pour la souche *Lactobacillus acidophilus*.

L'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales intestinales est une étape cruciale et préalable à la colonisation bactérienne dans le tube digestif ce qui donne un meilleur échange de signaux entre les bactéries et les cellules de tube digestif, inhibant aussi la colonisation du tractus intestinal par des bactéries pathogènes (**Kachouri et al., 2015**). La capacité d'adhésion des probiotiques peut être affectée par plusieurs facteurs, tels que les liaisons non spécifiques, y compris les interactions électrostatiques et hydrophobes, et la liaison spécifique aux molécules (**Jeong et al., 2021**).

#### III.2.2.4. Résistance aux sels biliaires et au pH gastrique

Le pH de l'estomac varie de 1 à 2 (pendant le jeûne) et de 4 à 5 (après un repas), tandis que la concentration physiologique de la bile humaine fluctue de 1,5 à 2 % (p/v) au cours de la première heure de digestion et se stabilise finalement à 0,3 % (p/v) (**Yang Li et al., 2019**). Pour considérer une souche comme probiotique, elle doit être capable de maintenir sa survie dans ces conditions de pH faible et des sels biliaires pour garantir qu'elle traverse l'intestin tout en offrant des avantages pour la santé de l'hôte (**Anandharaj et al., 2015**).

Les sels biliaires sont des produits chimiques tensioactifs produits dans le foie pour le métabolisme du cholestérol. Les sels biliaires endommagent la membrane cellulaire bactérienne conduisant à la mort cellulaire. Pour cette raison, il est important pour la souche probiotique de tolérer les sels biliaires pour passer la voie intestinale (**Bindu et Lakshmidevi, 2020**).

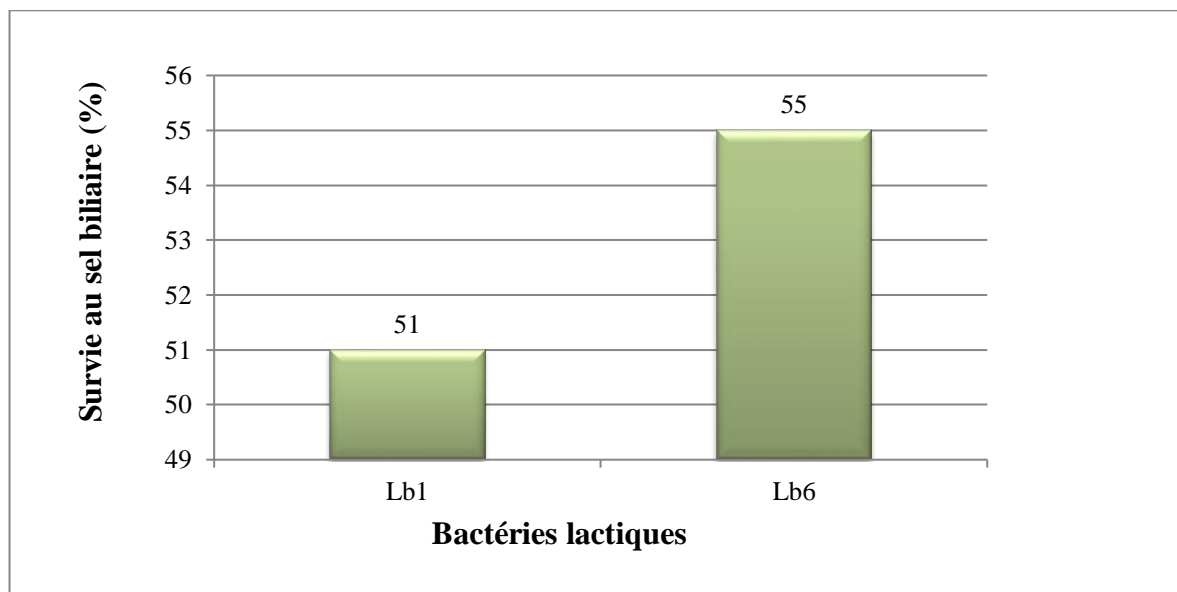
Les résultats de la tolérance de Lb1 et Lb6 aux sels biliaires sont illustrés par la **figure 10**. Les deux lactobacilles ont présenté une résistance aux sels biliaires avec un taux de survie égale à 51% pour Lb1 et 55% pour Lb6. À ce titre, des pourcentages de survie élevés indiquent une bonne tolérance aux sels biliaires, cela peut être due à la présence de polysaccharides sur la membrane externe (**Alameri et al., 2022**).

Une étude menée par **Fessard et al. (2019)** sur les bactéries lactiques isolées des fruits et légumes tropicaux ont montré que le pourcentage de tolérance aux sels biliaires des souches de

*Leuconostoc* était compris entre 35% -55.8% et entre 61 % -83,8 % pour *L.Plantarum*. Par ailleurs **Khalil et al. (2018)** ont obtenu une bonne tolérance aux sels biliaries avec les *Lactobacillus* (*L. plantarum* et *L. fermentum*) isolées de certains aliments fermentés traditionnels malaisiens avec un pourcentage de survie variable entre 71.31%- 98.15%.

L'étude de **Pumriw et al. (2021)** sur des bactéries lactiques probiotiques (*P. pentosanes*, *Lb. Plantarum*, *Lb. brevis* et *Lb. Fermentum*) isolées d'un produit végétal à feuilles fermenté, a montré un pourcentage de survie au sel biliaire variant de 65,59 à 95,13 %. D'autre part **Anandharaj et al. (2015)** ont rapporté que *L. crispatus* GI9 et *W. koreensis* FKI21 isolé du concombre fermenté été résistante aux sels biliaries à 0,3 % avec 81.26% et 84.08% respectivement. De même, **Shukla et Goyal. (2014)** ont montré que *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 isolé du concombre fermenté avait un taux de survie de  $73.33 \pm 4.2$  % en présence de 0.3 % de sels biliaries.

En outre **Ahmed et al. (2021)** ont considéré que les bactéries lactiques d'origines végétales sont moins résistantes aux sels biliaries, cependant certaines souches de *L. plantarum* étaient significativement résistantes aux sels biliaries.



**Figure 10:** Pourcentage de survie des bactéries lactiques Lb1 et de Lb6 en présence de 0,3% de sels biliaries.

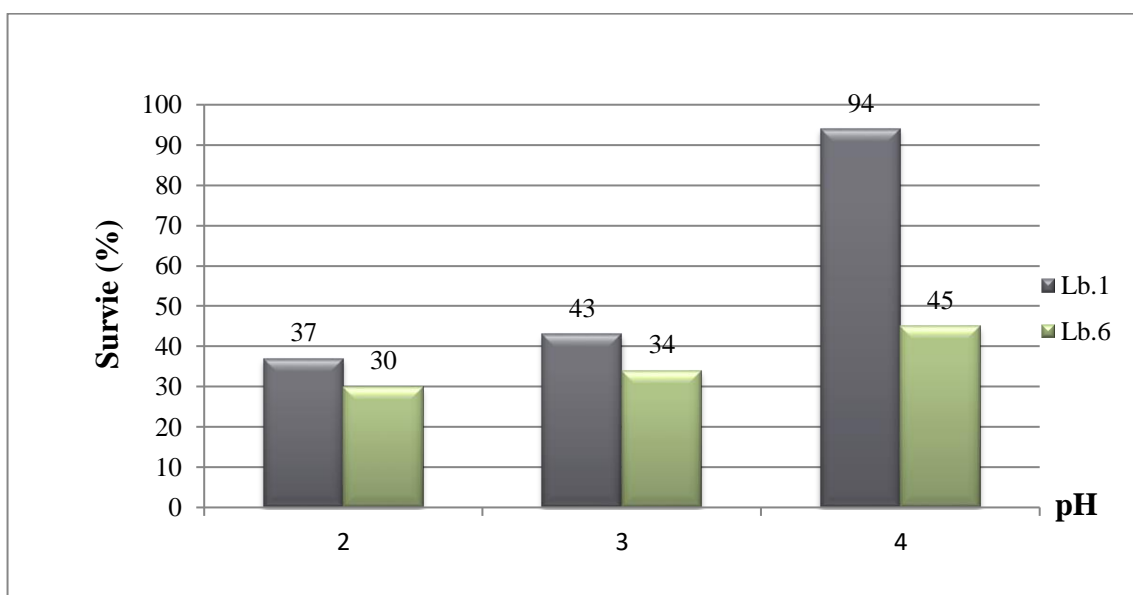
Les résultats de la survie *in vitro* de Lb1 et de Lb6 dans les trois milieux de pH 2, pH 3 et pH 4 sont illustrés dans la **figure 11**. Les résultats démontrent une diminution de la résistance des deux lactobacilles avec la diminution de pH comme suit :

- À pH 2, le taux de survie était de 37% pour Lb1 et de 30% pour Lb6.

- À pH 3 le taux de survie a augmenté jusqu'à 43% pour Lb1 et 34% pour Lb6.
- À pH 4 le taux de survie a enregistré un maximum de 45% pour Lb6 et 94% pour la Lb 1 c'est-à-dire une augmentation de 51%.

**Liu et al. (2021)** ont confirmé que les bactéries lactiques d'origine végétale avaient une haute tolérance aux pH acides. D'après **Ahmed et al. (2021)** *Lactiplantibacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* utilisées comme starters dans le concombre fermenté avaient un taux de survie entre 25% - 87% à pH 3. *L. crispatus GI9* et *W. koreensis FK121* isolées du concombre fermenté ont présenté une résistance à pH 3 après 3 h d'incubation avec un pourcentage de survie variant entre 90.16% et 94.98%, respectivement (**Anandharaj et al., 2015**). Ainsi **Lim et al. (2018)** ont trouvé que *L. plantarum* isolée de kimichi avait un taux de survie variant entre 90.9%-99.0% à pH3.

Les deux bactéries lactiques Lb1 et Lb6 ont présenté une bonne tolérance aux sels biliaires et ont gardé une survie dans des conditions de pH gastrique. Généralement la survie des souches bactériennes dans des conditions de pH acide est une indication plus précise sur la capacité des souches à survivre au passage dans l'estomac (**Chen Liu et al., 2022**).



**Figure 11:** Pourcentage de survie des bactéries lactiques Lb1 et de Lb6 aux pH 2,pH 3 et pH 4.



# **Conclusion**

Notre travail avait comme objectif l'étude du potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées de concombre lactofermenté ainsi que la qualité nutritionnelle du produit. L'isolement et la purification des bactéries lactiques ont été effectués à partir d'un échantillon de concombre fermenté traditionnellement (fermentation spontanée).

Dans la première partie, nous avons évalué la qualité de concombre lactofermenté en déterminant des paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Sur le plan de la caractérisation des flores microbiologiques du concombre lactofermenté contenait une charge en bactéries lactiques, en flore secondaire est présentée par les levures, les moisissures et la FTAM. Deux isolats lactiques ont été sélectionnés : Lb1 et Lb6 caractérisés par la forme bacille.

Dans la deuxième partie, le potentiel probiotique des bactéries lactiques Lb1 et Lb6 a été évalué *in vitro*. Les résultats ont montré que Lb1 et Lb6 présentaient un bon potentiel probiotique. Ces dernières ont démontré leur capacité à résister à des conditions hostiles à savoir envers l'acidité de pH acide et des sels biliaries. Les deux bactéries lactiques avaient une bonne capacité d'auto-agrégation, la co-agrégation avec l'agent pathogène, et une bonne adhésion aux cellules épithéliales et aux solvants.

Les résultats de notre étude permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives, pour compléter ce travail, nous proposons :

- Une analyse physicochimique du produit plus approfondie ;
- Une analyse de composition (profil aromatique, acides organiques) ;
- Une étude moléculaire pour déterminer les populations microbiennes des pickles de concombre ;
- Une caractérisation génétique des bactéries lactiques isolées.
- Résistance aux antibiotiques.
- Activité antimicrobienne.



# Références

## (A)

- Adams, M., & Moss, M. (2000).** Food microbiology. Royal society of chemistry. (éd. 3<sup>ème</sup>). RSC Publishing, p310 - 369
- Ahmed, S., Ashraf, F., Tariq, M., & Zaidi, A. (2021).** Aggrandizement of fermented cucumber through the action of autochthonous probiotic cum starter strains of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Annals of Microbiology*, 71(1), p1-23.
- Ait Belgnaoui, A. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress: rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, p191.
- Akhtar, G., Bhat, N. A., Masoodi, F. A., & Gani, A. (2021).** Small-and Large-Scale Production of Probiotic Foods, Probiotic Potential and Nutritional Benefits. In *Advances in Probiotics*, Academic Press, p365-395.
- Alameri, F., Tarique, M., Osaili, T., Obaid, R., Abdalla, A., Masad, R., ...& Ayyash, M. (2022).** Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: Potential probiotic and postbiotic characteristics Including immunomodulatory effects. *Microorganisms*, 10(2), p389.
- Aljahani, A. H. (2020).** Microbiological and physicochemical quality of vegetable pickles. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(6), p415-421.
- Al-Shawi, S. G., & Alneamah, S. J. A. (2021).** Cucumber Pickles and Fermentations. In *Cucumber Economic Values and Its Cultivation and Breeding*. Intech Open, p228.
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015).** Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi pharmaceutical journal*, 23(2), p107-114.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015).** Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in microbiology*, 166(5), p428-439.



**AOAC. Official Methods of Analysis 15th Edition of the Association of Official Analytical Chemists. 1990.** Determination of Ash in Foods; Standards Press of China: Beijing, China, p2003.

**AOAC (2000).** Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, DC. **ISO 4833-:2013.** Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms—Part1: Colony Count at 30 Degrees C by the Pour Plate Technique, International Standard Organization, Switzerland, p1-12

**Ashaolu, T. J., & Reale, A. (2020).** A holistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms*, 8(8), p1176.

**Azcarate-Peril, M. A., Arnold, R. R., & Bruno-Bárcena, J. M. (Eds.). (2019).** How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota: A Nutrition Continuum. Springer Nature. p366

(B)

**Bangar, S. P., Suri, S., Trif, M., & Ozogul, F. (2022).** Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience*, 46, p101615.

**Barbu, V. (2008).** Phenotypical characterization of several lactic acid bacteria strains isolated from wheat's epiphyte microbiota. *Romanian Biotechnological Letters*, 13(6), p4074-4085.

**Bautista-Gallego, J., Medina, E., Sánchez, B., Benítez-Cabello, A., & Arroyo-López, F. N. (2020).** Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites*, 71(2), p358-358.

**Behera, S. S., El Sheikha, A. F., Hammami, R., & Kumar, A. (2020).** Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits?. *Journal of Functional Foods*, 70, p103971.

**Belkhir, K. (2017).** Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bela faculté des sciences de la nature et de la vie département de biotechnologie, p198.

**Bell, V., Ferrão, J., Pimentel, L., Pintado, M., & Fernandes, T. (2018).** One health, fermented foods, and gut microbiota. *Foods*, 7(12), p195.

**Benreguiég, M. (2015).** Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l'Ouest Algérien (Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie, p181.

**Bindu, A., & Lakshmidévi, N. (2021).** Identification and in vitro evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. *Archives of microbiology*, 203(2), p579-595.

**Bouguerra, A. (2021).** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 faculté des sciences de la nature et de la vie département de microbiologie, p141.

**Bouridane, H., Sifour, M., Idoui, T., Annick, L., & Thonard, P. (2016).** Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(3), p192.

(C)

**Çelik, E., & CELEBİOĞLU, HU (2021).** Effets de la capsanthine sur l'hydrophobicité de surface et les propriétés d'auto-agrégation de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal international des sciences de l'environnement agricole et de l'alimentation*, 5 (2), p243-249.

**Chen, Y. S., Wu, H. C., Yu, C. R., Chen, Z. Y., Lu, Y. C., & Yanagida, F. (2016).** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from xi-gua-mian (fermented watermelon), a traditional fermented food in Taiwan. *Italian Journal of Food Science*, 28(1), p9-14.

**Chen, Y., Wu, H., Lo, H., Lin, W., Hsu, W., Lin, C., ... Yanagida, F. (2012).** Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from jiang-gua (fermented cucumbers), a traditional fermented food in Taiwan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), p2069–2075.

(D)

**Da Cruz, A. G., Faria, J. D. A. F., Saad, S. M. I., Bolini, H. M. A., Sant, A. S., & Cristianini, M. (2010).** High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in food science & technology*, 21(10), p483-493.

**De Matos, A. D., Marangon, M., Magli, M., Cianciabella, M., Predieri, S., Curioni, A., & Vincenzi, S. (2019).** Sensory characterization of cucumbers pickled with verjuice as novel acidifying agent. *Food chemistry*, p286, 78-86.

**Dias, F. S., Duarte, W. F., Santos, M. R. R. M., Ramos, E. M., & Schwan, R. F. (2013).** Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. *Journal of food protection*, 76(6), p991-998.

**Di Cagno, R., & Coda, R. (2014).** Fermented foods: Fermented vegetable products. In *Encyclopedia of food microbiology*. Elsevier Academic Press, p875-883.

**Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013).** Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), p1-10.

**Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., & Collins, J. K. (2001).** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), p386-392.

#### (E)

**Ebel, B. (2012).** Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne– AgroSup Dijon, p205.

**Ekmekçi, H., Aslim, B., & Darilmaz, Ö. D. (2009).** Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from Turkish women. *Archive Biology and Sciences*, 61(3), p407-412.

#### (F)

FAO/WHO (2001) Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Acid Bacteria. Scientific Research Publishing, p1-34

**Farnworth E.R., (2008).** Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct.Med. Foods*, 1. p57-68.

**Featherstone, S. (Ed.). (2015).** A complete course in canning and related processes: Volume 3 Processing Procedures for Canned Food Products. Woodhead Publishing, p445-480

**Fessard, A. (2017).** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de la Réunion, p192.

**Fessard, A., & Remize, F. (2019).** Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. *International journal of food microbiology*, 301, p61-72.

(G)

**Gao, Y., & Li, D. (2018).** Screening of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering and triglyceride-lowering activity in vitro and evaluation of probiotic function. *Annals of Microbiology*, 68(9), p537-545.

**Gezginç, Y., & İnanç, Ö. (2021).** Chemical, microbiological and sensory properties of acur (*cucumis melo* var. *flexuosus*) pickles produced using salt and vinegar at different concentrations. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 5(3), p290-302.

**Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009).** Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), p3-20.

**Guan, Q., Xiong, T., & Xie, M. (2021).** Influence of probiotic fermented fruit and vegetables on human health and the related industrial development trend. *Engineering*, 7(2), p212-218.

**Guillou, A. A., & Floros, J. D. (1992).** Problems associated with the processing of cucumber pickles: softening, bloater formation and environmental pollution. In *Developments in Food Science* ,29, p499-514.

(H)

**Handa, S., & Sharma, N. (2016).** In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang—A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), p91-97.

**Hartanto, I., & Fevria, R. (2020, August).** Characteristics of Lactic Acid Bacterium Which are Isolated From Pineapple Pickles, Cucumber and Carrots. In *International Conference on Biology, Sciences and Education (ICoBioSE 2019)*. Atlantis Press, p71-73.

(I)

**Idoui, T., & Karam, N. E. (2008).** Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, 59(4), p361-367.

**Izquierdo Alegre, E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. These de doctorat. Université de Strasbourg, p215.

**ISO 4833-: 2013. (2013).** Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.

(J)

**Jeong, C. H., Sohn, H., Hwang, H., Lee, H. J., Kim, T. W., Kim, D. S., ...& Hong, S. W. (2021).** Comparison of the probiotic potential between *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from kimchi and standard probiotic strains isolated from different sources. *Foods*, 10(9), p2125.

(K)

**Kachouri, F., Ksontini, H., Kraiem, M., Setti, K., Mechmeche, M., & Hamdi, M. (2015).** Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), p7924-7933.

**Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., & Settharaksa, S. (2013).** In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22, p6-13.

**Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013).** Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, p2013.

**Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018).** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), p927-939.

**Khalil, E. S., Manap, M. Y., Mustafa, S., Amid, M., Alhelli, A. M., & Aljoubori, A. (2018).** Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing *Lactobacillus* isolated from some traditional Malaysian fermented foods. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), p287-298.

**KHODJA, B. (2018).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat. Université djillali liabes de sidi bel abbes, p100.

**Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., & Yoo, J. W. (2016).** Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of pharmaceutical investigation*, 46(4), p377-386.

**Kim, K. H., & Cho, H. S. (2008).** Physicochemical and microbiological properties of skate (*Raja kenosjoi*) kimchi on the market. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 23(2), p235-242.

**Korus, A., Bernaś, E., & Korus, J. (2021).** Health-promoting constituents and selected quality parameters of different types of kimchi: fermented plant products. *International Journal of Food Science*, 2021.

**Kumari, A., Angmo, K., & Bhalla, T. C. (2016).** Traditional pickles of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, Vol. 15(2), p330-336

(L)

**Lee, Kang Wook; Shim, Jae Min; Park, Seon-Kyung; Heo, Ho-Jin; Kim, Hyun-Jin; Ham, Kyung-Sik; Kim, Jeong Hwan (2016).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT - Food Science and Technology*, 71, p130–137.

**Li, J., Ai, L., Xu, F., Hu, X., Yao, Y., & Wang, L. (2022).** Structural characterization of exopolysaccharides from *Weissella cibaria* NC516. 11 in distiller grains and its improvement in gluten-free dough. *International Journal of Biological Macromolecules*, 199, p17-23.

**Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., & Feng, F. (2019).** In vitro and in vivo investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(4), p1893-1903.

**Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., & Tsen, H. Y. (2007).** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3-4), p107-113.

**Liu, C., Xue, W. J., Ding, H., An, C., & Ma, S. J. (2021).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, p 4168.

**Luang-In, V., Saengha, W., Karirat, T., Deeseenthum, S., Buranrat, B., Nudmamud-Thanoi, S., ...& Narbad, A. (2021).** Attributs probiotiques, capacité de production de GABA et effets cytotoxiques des microbes isolés des aliments fermentés thaïlandais. *International Journal of Agriculture And Biology*, 25 (2), p409-419.

#### (M)

**Mani, A., Ghosh, A., Dey, K., & Bhattacharjee, A. (2017).** Effect of sodium substitution on lactic acid bacteria and total bacterial population in lime pickle under ambient storage conditions. *The Pharma Innovation Journal*, 6(11), p682-686.

**Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., Méndez, A. I. R., & Hernández-Sánchez, H.(2013).** In Vitro evaluation of the probiotic potential of halotolerant lactobacilli isolated from a ripened tropical Mexican cheese. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(4), p239-251.

**MERMOURI, L. (2018).** Étude de l'effet de souches probiotiques de bactéries Lactiques (*Lactobacillus* spp.), isolées de produits fermentés, sur la valeur nutritive de fourrages conservés par ensilage. Thèse de Doctorat. Université Mohamed Boudiaf des Sciences et de la Technologie-Mohamed Boudiaf d'Oran, p177.

#### (N)

**Najett, M. M. (2018).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse de dooctorat. Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis, p196.

**Nivoliez, A., Veisseire, P., Alaterre, E., Dausset, C., Baptiste, F., Camarès, O., . . . Bornes, S. (2015).** Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, p399–411.

## (O)

**Ogrodowczyk, A. M., & Drabinska, N. (2021).** Crossroad of tradition and innovation-the application of lactic acid fermentation to increase the nutritional and health-promoting potential of plant-based food products-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 71(2), p107–134.

## (P)

**Peng, Q., Jiang, S., Chen, J., Ma, C., Huo, D., Shao, Y., & Zhang, J. (2018).** Unique microbial diversity and metabolic pathway features of fermented vegetables from Hainan, China. *Frontiers in microbiology*, 9, p399.

**Pimentel, T. C., Klososki, S. J., Rosset, M., Barão, C. E., & Marcolino, V. A. (2019).** Fruit juices as probiotic foods. In *Sports and energy drinks*. Woodhead Publishing, p483-513

**PIQUEPAILLE, C. (2013).** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse de doctorat . Université de Limoges, p183.

**Prasad, K. (2019).** CUCUMBER VEGETABLE AS A BRINE. New Delhi: Ivi Chakraborty, Prodyut Kumar Paul, Arghya Mani, Arun Kumar Tiwary and K. Prasad. Today & Tomorrow's Printers and Publishers, p447-462.

**Pumriw, S., Luang-In, V., & Samappito, W. (2021).** Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Pak-Sian for Use as a Starter Culture. *Current Microbiology*, 78(7), p2695–2707.

## (R)

**Rossoni, R. D., de Camargo Ribeiro, F., de Barros, P. P., Mylonakis, E., & Junqueira, J. C. (2020).** A prerequisite for health: probiotics. In *Microbiomics*. Academic Press. p225-244

## (S)



- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattila-Sandholm, T. (2002).** Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), p99-117.
- Şanlıer, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2019).** Health benefits of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(3), p506-527.
- Shukla, R., & Goyal, A. (2014).** Probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: a new isolate from fermented cucumber. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6(1), p11-21.
- Silva, D. R., Sardi, J. D. C. O., de Souza Pitangui, N., Roque, S. M., da Silva, A. C. B., & Rosalen, P. L. (2020).** Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Journal of Functional Foods*, 73, p104080.
- Simões, L., Fernandes, N., de Souza, A., dos Santos, L., Magnani, M., Abrunhosa, L., ... & Dias, D. R. (2022).** Probiotic and antifungal attributes of lactic acid bacteria isolates from naturally fermented Brazilian table olives. *Fermentation*, 8(6), p277.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., & Thaker, V.(2011).** Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), p287-290.
- Singh, K., & Rao, A. (2021).** Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. *Nutrition Research*, 87, p1-12.
- Standard GB/T5009.4-2003;** Determination of Ash in Foods; Standards Press of China: Beijing, China, 2003
- Sultana, S., Iqbal, A., & Islam, M. N. (2014).** Preservation of carrot, green chilli and brinjal by fermentation and pickling. *International Food Research Journal*, 21(6), p2405-2412
- Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C., & Rani, R. P. (2014).** Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology research international*, 2014, p1-19.
- Szutowska, J. (2020).** Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review. *European Food Research and Technology*, 246(3), p357-372

## (T)

**TAHLAITI, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Thèse de doctorat .Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis, p205.

**Tamang, J. P. (2014).** Biochemical and modern identification techniques: Microfloras of fermented foods. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3, p250–258

## (U)

**Uthpala, T. G. G., Marapana, R. A. U. J., Lakmini, K., & Wettimuny, D. C. (2020).** Nutritional bioactive compounds and health benefits of fresh and processed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sumerianz Journal of Biotechnology*, 3(9), p75-82.

## (V)

**Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., ...& Bezirtzoglou, E. (2020).** Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. *Foods*, 10(1), p69.

## (W)

**Wang, M. F., Lin, H. C., Wang, Y. Y., & Hsu, C. H. (2004).** Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15(2), p152-158.

**World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (1993).** Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, p56,599.

## (Y)

**YAHLA, I. (2017).** Effets anti-obésité et anti-inflammatoires de certaines bactéries probiotiques associées ou non aux isomères conjugués de l'acide linoléique. Thèse de doctorat. Université djillali liabes de sidi bel abbes, p157.

## (Z)

**Zeng, Y., Li, Y., Wu, Q. P., Zhang, J. M., Xie, X. Q., Ding, Y., & Wang, J. (2020).** Evaluation of the Antibacterial Activity and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Chinese Homemade Pickles. *Canada Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, p1-11.

**Zieliński, H., Surma, M., & Zielińska, D. (2017).** The naturally fermented sour pickled cucumbers. In *Fermented foods in health and disease prevention*. Academic Press, p503-516.



# **Annexes**

**Annexes 2 : Composition des milieux de cultures et des tampons****❖ Milieu MRS (Bouillon et gélose) à pH 6.5 :**

Ingrédients	Unité
<b>Peptone</b>	<b>10g</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>8g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>4g</b>
<b>Acétate de sodium</b>	<b>5g</b>
<b>Phosphate bipotassique</b>	<b>2g</b>
<b>Citrate d'ammonium</b>	<b>2g</b>
<b>Sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>2g</b>
<b>Sulfate de manganèse, 4H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.05g</b>
<b>Glucose</b>	<b>20g</b>
<b>Tween 80</b>	<b>1g</b>
<b>Agar (dans le cas de la gélose)</b>	<b>15g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min

**❖ Milieu PCA à pH 7,0**

Ingrédients	Unité
<b>Tryptone</b>	<b>5g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>2.5g</b>
<b>Glucose</b>	<b>1g</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>15g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

❖ Mlieu OGA

Ingrédients	Unité
<b>Extrait autolytique de levure</b>	5g
<b>Glucose</b>	20g
<b>Agar bactériologique</b>	15g
<b>Eau distillée</b>	1000ml

Autoclavage à 120°C pendant 20min

❖ Gélose nutritive à ph=7,0

Ingrédients	Unité
<b>Peptone</b>	5 g/l
<b>Extrait de viande</b>	1 g/l
<b>Extrait de levure</b>	2.5 g/l
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g/l
<b>Agar-agar</b>	15 g/l

❖ Tampon PBS (Bouillon phosphate saline) à pH =7.2

Ingrédients	Unité
<b>K<sub>2</sub>HP<sub>04</sub></b>	1.22g
<b>KH<sub>2</sub>P<sub>04</sub></b>	0.34g
<b>Na cl</b>	8g
<b>Eau distillée</b>	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min.

❖ **Eau physiologique Eau physiologique à pH 7,0**

Ingrédients	Unité
<b>Chlorure de sodium</b>	8,5 g
<b>Eau distillée</b>	1000 mL

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

❖ **Eau peptonée pH 7,2**

Ingrédients	Unité
<b>Peptone exempt d'indole</b>	10 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

❖ **Solution de phénophtaléine 0,1%**

-Faire dissoudre 0.1g de phénophtaléine dans une 10ml d'éthanol 95%.

❖ **Indicateur de Tashiro**

- Faire dissoudre 0.2 g de rouge de méthyle et 0.1 g de bleu de méthylène dans 100 mL d'éthanol 95%



<p><b>Réalisé par :</b> M<sup>elle</sup>: BELKERDID Hind M<sup>elle</sup>: BOUANK Imen M<sup>me</sup>: BOUCHAIB Ines</p>	<p><b>Encadreur :</b> Dr.BOUCHEFRA Amina <b>Date de soutenance :</b> 10/09/2022</p>
<p><b>Thème :</b> Étude de quelques propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées des pickles et contrôle de qualité du produit fini.</p>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>L'objectif de ce travail était de chercher de nouvelles bactéries lactiques aux propriétés probiotiques isolées d'un produit végétal lactofermenté traditionnellement « pickles de concombre » ainsi que d'étudier la qualité nutritionnelle de ce produit. Par conséquent, cinq tests microbiologiques majeurs ont été réalisés sur nos isolats lactiques afin de déterminer leurs propriétés probiotiques. Les résultats ont montré que notre produit « pickles de concombre » est de bonne qualité et que les bactéries lactiques testées ont montré une bonne survie aux pH acide et aux sels biliaries, de bons résultats d'auto et de co-agrégation, avec une adhésion au tissu épithélial et aux solvants.</p> <p><b>Mots clés:</b> Bactérie lactique, probiotique, pickles, concombre, lactofermentation, qualité</p>	
<p><b>Abstract</b></p> <p>The objective of this work was to search for new lactic acid bacteria with probiotic properties isolated from a lacto-fermented vegetable product traditionally called "cucumber pickles" and to study the nutritional quality of this product. Therefore, five major microbiological tests were performed on our lactic isolates to determine their probiotic properties. The results showed that our "cucumber pickles" product is of good quality and that the tested lactic acid bacteria showed good survival to acid pH and bile salts, good auto and co-aggregation results, with adhesion to epithelial tissue and solvents.</p> <p><b>Key words:</b> lactic acid bacteria, probiotic, pickles, cucumber, lactofermentation, quality</p>	
<p style="text-align: right;"><b>ملخص</b></p> <p>الهدف من هذا العمل هو البحث عن بكتيريا حامض اللاكتيك جديدة ذات خصائص بروبيوتيكية تم عزلها من منتج نباتي مخمر تقليديا "مخلل الخيار" ودراسة جودته ونوعيته. لذلك، تم إجراء خمسة اختبارات ميكروبيولوجية رئيسية على بكتيريا حامض اللاكتيك المعزولة لدينا لتحديد خصائصهم البروبيوتيكية. النتائج أظهرت أن "مخلل الخيار" ذو نوعية جيدة وأن بكتيريا اللاكتيك التي تم اختبارها أظهرت مقاومة جيدة عند درجة الحموضة المنخفضة والأملاح المعوية، ونتائج جيدة للإلتصاق الذاتي والمشارك و الإلتصاق بالأنسجة المعوية و والمذيبيات.</p> <p style="text-align: right;"><b>الكلمات المفتاح :</b> بكتيريا حامض اللاكتيك, بروبيوتيك, مخللات , الخيار, تخمر لبني</p>	