الجمهـورية الجـزائـريـة الديـمقـراطيـة الشـعبيـة
وزارة التعليـم العـالـي و البـحـث العلـمـي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحي – جيجل
Université Mohammed Seddik Benyahia - de Jijel

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

كلية عـلوم الطـبيعة والحـياة
قسـم:الميكروبيولوجيا التطبيقية وعـلوم التغذية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Qualité de jus de concombre fermenté et évaluation de la viabilité et des performances probiotiques de *Lactobacillus plantarum*

Membres de Jury
Président : Mr. Rahmoune Yazid
Examinatrice : Mme. Bouchefra Amina
Encadreur : Pr. Idoui Tayeb

Présenté par :
Melle : Boumeslat Meriem
Melle : Nettour Samah

Année Universitaire 2016 - 2017

Numéro d'ordre(bibliothèque):.....

*Avant tout nous remercions « **Allah** » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous tenons nos plus vifs remerciements à notre encadreur **le professeur Tayeb Idoui**, pour ces conseils scientifiques judicieux, sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité, sa confiance et également son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.*

*Nos remerciements vont également aux membres de jury **Mr Rahmoune .Y** et **Mme Bouchefra .A** D'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Un grand merci se passe aussi à monsieur **Khennouf .T** pour les aides et les informations qu'il a bien voulu de nous fournir.*

*Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie notamment **Mme Nedjla** et **Mme Houria.***

*Nous s'insère remerciements vont passe également à **Mme Rouikha Naima**, responsable de laboratoire de biochimie, faculté des sciences exacte.*

Nous chaleurs remercions s'adresse à nos chers parents et nos frères et sœurs pour ces encouragements pour leur soutient tout au long de nos études et durant ce mémoire.

Enfin, le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé de prés ou de loin à sa réalisation et auxquelles d'ailleurs nous exprimons de tout cœur nos remerciements.

Merci à tous

Meriem ***Samah***

Remercient

Boumeslat Meriem :

Je didié le présent travail :

A la plus belle créature que Dieu à crée sur terre…

A la source de tendresse, de patience, de gentillesse ….

*A **ma mère**.*

*A mes sœurs : **Soumia**, **Saida** et **Asma***

*A toute la famille **Boumeslat** et **Lamara***

*A tous **mes amies** et également à tous **les collèges** de la promon 2016/2017*

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continue.

Meriem

Sommaire

Introduction
……1

Pertie I : étude bibliographique

Chapitre I : Les bactéries probiotiques

I.1. Définition du terme probiotique ……..2

I.2. Microorganismes probiotiques ……2

I.3. Genre *Lactobacillus* ……..3

I.3.1. L'espèce *Lactobacillus plantarum* ……...4

I.4. Critères de sélection d'une bactérie probiotique 5

I.5. Produits probiotiques ……...……6

I.6. Mécanismes d'action des probiotiques ……6

I.6.1. Fonction de barrière……...6

I.6.2. Production de substances antimicrobiennes ……...……6

I.6.2.1. Bactériocines…….....7

I.6.2.2. Bio surfactants ……..7

I.6.2.3. Peroxyde d'hydrogène……...……..……7

I.6.2.4. Acide lactique ……...…….....7

I.6.3. Concurrence pour l'adhésion ……....7

I.7. Aptitudes probiotiques ……..8

Chapitre II. Les probiotiques dans les aliments fermentés

II.1. Aliments fermentés ……..10

II.2. Jus de légumes lacto-fermentés …….....10

II.3. Viabilité des probiotiques dans les jus fermentés ……..……..11

II.4. Survie des probiotiques dans les aliments fermentés …….....11

II.4.1. Survie pendant le processus de fabrication ……12

II.4.1.1. Température de fermentation……12

II.4.1.2. Congélation…….....12

II.4.1.3. Séchage et la déshydratation……...12

II.4.2. Survie pendant le stockage……13

II.4.2.1. Ingrédients et additifs alimentaires……13

II.4.2.2. Teneur en oxygène et le potentiel redox……....13

II.4.2.3. Taux d'humidité / activité de l'eau……....13

II.4.2.4. Température de stockage……..13

II.4.2.5. pH et acidité…….……...14

II.4.2.6. Aspects de l'emballage……14

Partie II : étude expérimentale

II.1. Matériel……15

II.1.1 Matériel biologique……..15

II.1.2. Milieux de culture……...15

II.1.3 Produits chimiques et réactifs……..15

II.2. Méthodes……..……16

II.2.1. Revivification de la souche……..16

II.2.2. Fabrication du jus de concombre et fermentation……...…16

II.2.2.1. Préparation de jus de concombre……...…16

II.2.2.2. Préparation de jus de concombre lacto-fermenté……...16

II.2.3. Contrôle de quelques paramètres physico-chimiques du jus de concombre brut …17

II.2.3.1. Dosage de la vitamine C (titrage direct)……17

II.2.3.2. Détermination de la teneur en protéine (Kjeldahl, 1883)……..18

II.2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)……19

II.2.3.4.Détermination de la teneur en matière minérale (MM)……..19

II.2.3.5.Détermination du taux des sucres totaux……19

II.2.3.6.Détermination du degré Brix……..20

II.2.3.7.Détermination de la teneur en métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique……..20

II.2.3.8. Dosage de potassium, calcium et de sodium par spectrophotométrie à flamme…….……21

II.2.3.8. Dosage des phénols totaux…….21

II.2.3.9. Dosage des flavonoïdes……..21

II.2.4. Contrôle de jus de concombre lacto-fermenté…….……21

II.2.4.1. Le pH……...21

II.2.4.2. Acidité titrable…….....22

II.2.4.3 Etude de la cinétique de croissance……..……22

II.2.4.4. Densité ……..…..22

II.2.4.5. Comptage des cellules viables……...……...…..22

II.2.4.6. Contrôle microbiologique……....23

II.2.4.6.1. Préparation des dilutions décimales……...23

II.2.4.6.2. Recherche et dénombrement des levures et moisissures……...23

II.2.4.6.3.Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)……23

II.2.5. Evaluation de l'effet matrice alimentaire et conservation sur les aptitudes probiotiques de*L.plantarum*……23

II.2.5.1. Ré-isolement de l'espèce *L.plantarum*……..23

II.2.5.2. Test d'hydrophobicité……24

II.2.5.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial…….24

II.2.5.4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation……25

II.2.5.5. Résistance aux sels biliaires……..26

II.2.5.6. Résistance au pH gastrique……26

Partie III : résultats et discussion

III.1. Evolution des paramètres physicochimiques du jus de concombre au cours de la fermentation et la conservation à 4°C……28

III.1.1. Evolution du pH et de l'acidité…….28

III.1.2. Evolution de la cinétique de croissance……..……30

III.1.3. Evolution de la densité …….32

III.1.4. Evolution du nombre de cellules viables ……34

III.1.5. Evolution de la teneur en vitamine C…….35

III.1.6. Teneur en matière sèche et en cendres……..36

III.1.7. Evolution de la teneur en sucres totaux……..38

III.1.8. Evolution du degré Brix……39

III.1.9. Evolution de la teneur en azote totale et en protéines……..40

III.1.10. Evolution de la teneur en polyphénols totaux…….41

III.1.11. Evolution de la teneur en éléments minéraux……42

III.1.12. Teneur en métaux lourds……..43

III.1.13. Evolution de la teneur en flavonoïdes……43

III.1.14. Contrôle microbiologique des jus de concombre……44

III.2. Evaluation de l'effet combiné matrice alimentaire - conservation sur quelques aptitudes probiotiques de *L.plantarum*……45

III.2.1. Hydrophobicité……45

III.2.2. Adhésion……48

III.2.3. Auto/Co-aggregation……...52

III.2.4.Résistance aux sels biliaires……57

III.2.5. Tolérance aux pH gastrique……59

Conclusion ……...61

Références …….62

Annexes

Figure Page

Figure 1: Diagramme de la préparation du jus de concombre lacto-fermenté ……..….17

Figure 2 : Evolution du pH et de l'acidité au cours de la fermentation du jus de concombre. 28

Figure 3 : Evolution du pH et de l'acidité de jus de concombre au cours de la conservation. 30

Figure 4 : Evolution de la cinétique de croissance au cours de la fermentation……....31

Figure 5 : Evolution de la cinétique de croissance au cours de la conservation…….....32

Figure 6 : Evolution de la densité durant la fermentation……...…….33

Figure 7 : Evolution de la densité au cours de conservation……...…….33

Figure 8 : Evolution du nombre de cellules au cours de la fermentation…….....34

Figure 9 : Evolution du nombre de cellules après la conservation ……35

Figure 10 : Evolution de la teneur en acide ascorbique du jus de concombre fermenté……..36

Figure 11 : Evolution de la teneur en matière sèche d jus de concombre fermenté…….37

Figure 12 : Evolution de la teneur en cendres du jus de concombre fermenté …….. ……38

Figure 13 : Evolution de la teneur en sucres totaux du jus de concombre fermenté ……..…38

Figure 14 : Evolution du degré Brix du jus de concombre fermenté …….40

Figure 15 : Evolution de teneurs en azote et en protéines du jus de concombre fermenté ….40

Figure 16 : Evolution des teneurs polyphénols du jus de concombre fermenté …….41

Figure 17 : Evolution de la teneur en calcium et en sodium du jus de concombre fermenté..42

Figure 18 : Teneur en Zn et Cu des échantillons de jus de concombre …….….43

Figure 19 : Evolution de la teneur en flavonoïdes dans le jus de concombre fermenté ……..44

Figure 20 : Pourcentage d'hydrophobicité de L.plantarum ré-isolée du produit fini et du bouillon MRS ……..45

Figure 21 : Pourcentage d'hydrophobicité après 5,10 et 15 jours de conservation du produit. …….…..48

Figure 22 : Nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales au mucus (culture ré-isolée du jus aprés6 heeures de fermentation)…….49

Figure 23 : Evolution du nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales et au mucus au cours du stockage …….50

Figure 24 : Pourcentage d'auto-agrégation du souche ré-isolée du produit fini …….……52

Figure 25 : Evolution du pourcentage d'auto-agrégation de la souche ré-isolée du produit conservé …….……..53

Figure 26 : Pourcentage de co-agrégation de la souche ré-isolée du produit fini ……...54

Figure 27 : Pourcentage de Co-agrégation de *L.plantarum* ré-isolée du produit conservé…55

Figure 28 : Pourcentage de survie de L.plantarum ré-isolée du produit en présence de 0.3% de sels ……...57

Figure 29 : Nombre de cellules viables en présence de 0.3% sels biliaires ……58

Figure 30 : Taux de survie de *L.plantarum* au différents pH …….59

Figure 31 : Nombre de cellules viables au cours de stockage à différents pH ……..….60

Photo Page

Photo 01: Photomicrographie de : [(a)]cellules épithéliales [(b)] : mucus ……..….48

Photo 02 : Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum ré-isolé du produit fini* [(a)] **:** cellules épithéliales (b) : mucus ……...49

Photo 03: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum ré-isolé du produit conservé 5 jours* [(a)] **:** cellules épithéliales (b) : mucus ……..51

Photo 04: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum ré-isolé du produit conservé 10 jours* [(a)] **:** cellules épithéliales (b) : mucus ……51

Photo 05: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum ré-isolé du produit conservé 15 jours* [(a)] **:** cellules épithéliales (b) : mucus……..51

Photo 06: Photomicrographie de l'auto-agrégation de la culture ré-isolée de [(a)] : du produit fini, [(b)] : 5j conservation [(c)] :10j conservation [(d)] : 15j conservation ……53

Photo 07: Photomicrographie de la co-agrégation de la culture ré-isolée de produit fini avec [(a)] : *E.coli*, [(b)] : *B.subtilus* [(c)] :*S.aureus* ……...55

Photo 08: Photomicrographie de la co-agrégation avec *E.coli* [(a)] : 5J, [(b)] : 10J [(c)] : 15J ……..56

Photo 09: Photomicrographie de la co-agrégation avec *S.aureus* [a)] : 5J, [(b)] : 10J [(c)] : 15J …..56

Photo 10: Photomicrographie de la co-agrégation avec *B.subtilis* [a)] : 5J, [(b)] : 10J [(c)] : 15J ….57

Tableau page

Tableau 1 : Les microorganismes considérés comme probiotiques …….……3

Tableau 2 : Résultats du contrôle microbiologique ……....44

***B**. : Bacillus*

BL : bactéries lactiques

***E**. : Escherichia*

***Lb**.* : *Lactobacillus*

***S**.* : *Staphylococcus*

Unités de mesures

DO : Densité Optique

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

%: Pourcentage

pH : potentiel d'hydrogène

sp : espèce

g, mg : Gramme, milligramme

h, min, s : heure, minute, seconde

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

M, mM : Molaire, millimolaire

N : Normalité

rpm : Rotation par minute

U : Unité

MS: Matière sèche

MM : Matière minérale

ST : sucres totaux

Autres abréviations :

UFC : Unité Formant Colonie

Auto : Autoagreggation

Vit C: VitamineC

FAO : Food and Agriculture Organization

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

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

PBS: phosphate urée sulfate magnésium.

Introduction

Depuis la découverte des probiotiques par **Elie Metchnikoff** en 1908, la recherche sur l'incorporation des microorganismes dans les aliments a pris une grande ampleur et par suite, il y à eu la naissance de la bactériothérapie et la notion des aliments fonctionnels. La recherche scientifique a prouvé que les produits fonctionnels aux probiotiques de différentes origines, animale et végétale ont des répercutions sur la santé, en raison de leurs propriétés nutritionnel et thérapeutiques **(Yepez et Tenea, 2015).** Cependant, le choix d'un probiotique est soumis à des règles et critères, parmi, leur viabilité et leur survie dans les aliments. Ce sont les paramètres les plus importants pour fournir les fonctions thérapeutiques demandées **(Succi** *et al.*, **2005).**

En raison de l'intérêt grandissant des aliments aux probiotiques, et pour répondre à la demande et aux exigences des consommateurs, des tat de formules ont été adoptées pour l'utilisation des jus de légumes comme matrice de commercialisation des microorganismes à effet bénéfique pour la santé, les probiotiques **(Dimitrovski** *et al.*, **2015).**

Par ailleurs, pour exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent être aptes à coloniser le tube digestif, ainsi, ils doivent avoir une aptitude d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte, cette aptitude est en relation avec el pourcentage d'hydrophobicité, une capacité de former des agrégats, c'est le phénomène d'auto-agrégation par formation de biofilm, et l'habilité de bloquer l'adhésion des pathogènes par le mécanisme de co-agrégation **(Dias** *et al.*, **2013).**

L'objectif de cette étude est de répondre à la problématique intitulé : évaluation de la viabilité des performances probiotiques de *Lactobacillusplantarum* sur jus de concombre *in vitro.*

Ce travail a été accomplit en trois parties :

- Une synthèse bibliographique qui va élargir nos connaissances sur les probiotiques, leurs critères de sélection et leurs modes d'actions ;
- L'ensemble des méthodes mis en œuvre pour répondre à la problématique posée: de la production de jus de concombre lacto-fermenté, du contrôle des paramètres physico-chimiques depuis le produit fini jusqu'à la fin de conservation et enfin l'étude de l'effet combiné matrice alimentaire – conservation sur quelques aptitudes probiotiques de la souche en question, après son ré-isolement du produit ;
- Une troisième partie comporte l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus, avec une interprétation et une discussion. Enfin la conclusion du travail effectué.

Etude bibliographique

Chapitre I. Les bactéries probiotiques

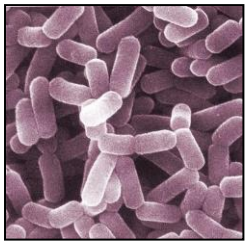
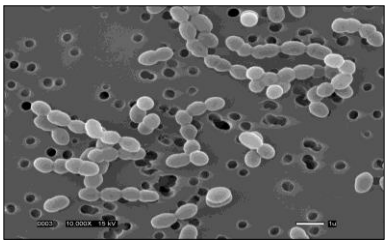
I.1. Définition du terme probiotique : Le terme probiotique est composé de deux mots, le mot latin « pro » qui signifie « pour » ou « en soutien » et l'adjectif grec « biotique » vient du nom bios qui signifie « vie ». Probiotique veut dire globalement « pour la vie » ou à l'appui de la vie **(Ezema, 2013).**

La définition finale retenue, est celle de la **FAO/OMS (2002)** qui définit les probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte ».

I.2. Les microorganismes probiotiques : En raison de la définition bien établie, le terme probiotique doit être réservé à des cellules vivantes qui peuvent être des bactéries, principalement les espèces des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, des levures non pathogènes, c'est le cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs, d'autres genres et espèces peuvent être également considérés comme probiotiques notamment, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus feacium*, *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc et Pediococcus* **(Tamang** *et al*., **2016 ; Tufarelli et Laudadio, 2016).**

Le tableau ci-dessous résume la liste des microorganismes considérés comme probiotiques.

Tableau 1 : Les microorganismes considérés comme probiotiques **(Kechagia** *et al*.**, 2013).**

Lactobacilles	***Bifidobacterium***	**Autres bactéries lactiques**	**Autres bactéries non lactiques**
			
***Lactobacillus*.sp**	***Bifidobacterium*. sp**	***Leuconostoc mesenteroides***	***E.coli***
L.acidophilus.	*B.adolescentis.*	*Enterococcus feacalis.*	*Bacillus cereus var.toyoi.*
L.casei.	*B.animalis.*	*E.feacium.*	*Esherichia coli strainnisste.*
L.crispatus.	*B.bifidum.*	*Lactococcus lactis.*	*Probionibactrium freudeneichii.*
L.gallinarum.	*B.breve.*	*Leuconostoc mesenteroides.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
L.gasseri.	*B.infantis.*	*Pediococcus acidilacrici.*	*S.boulardii.*
L.johnsonii.	*B.lactis.*	*Sporolactobacillus inulinus.*	
L.paracasei.	*B.longum.*	*Streptococcus thermophilus.*	
L.plantarum.			
L.reuteri.			
L.rhamnosus			

I.3.Le genre *Lactobacillus* **:** Le genre Lactobacillus groupe un nombre important de bactéries lactiques. Le genre *Lactobacillus* appartient au groupe de Lactobacillales et regroupe près de 200 espèces qui sont des bâtonnets hétérogènes gram positive, aérobies-anaérobies facultatifs, catalase négative, non sporulés, généralement non mobiles et leurs cellules sont souvent organisées en chaines. Les *Lactobacillus* demandent une température de croissance optimale entre 30 et 40°C et un pH entre 3 et 8 où elles produisent l'acide lactique à partir de la conversion des sucres. *Lactobacillus* sp colonisent les cavités buccales, l'intestin et les voies génitales féminines ou ils jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la flore microbienne de ces régions **(Foschi** *et al*., **2016 ; Taale** *et al*., **2016).**

Le Lactobacilles sont devisés en trois sous-genres, *Streptobacterium*, *Betabacterium* et *Themobacterium*. En 1986, une nouvelle classification des lactobacilles en trois groupes est proposée par **Kandler** et **Weiss** comme suite **(Todorov et Franco, 2010)** :

- ✓ Groupe A (*Thermobacterium),* regroupe seulement les espèces homofermentatives strictes, il comprend 15 espèces primaires, comme exemple, *L.acidophilus*.
- ✓ Groupe B (Streptobacterium), comprend l'ensemble des espèces hétéro-fermentatives facultatives produisant l'acide lactique à partir du glucose, d'acide acétique, d'acide formique et de l'éthanol, parmi les exemples, *L.plantarum* et *L.casei.*
- ✓ Groupe C (Betabacterium), comprend seulement les espèces hétéro-fermentatives strictes dont l'acide lactique et l'acide acétique sont les métabolites finaux, comme exemple, *L.brevis* et *L.fermentum.*

Dans le corps humain, les *Lactobacillus* contribuent à la production d'enzymes pour métaboliser les protéines et les glucides, la synthèse de vitamines B et K, facilitent la déconjugaison des sels biliaires, renforcent l'immunité et inhibent les inflammations, ainsi qu'elles réduisent le risque de caries lors de la consommation à long terme **(Pandya, 2016).**

En outre, les *Lactobacillus* sont très utiles en microbiologie alimentaire et notamment dans la nutrition humaine en raison de leur contribution à la production des aliments fermentés ainsi que leur utilisation comme probiotiques dans les produits pharmaceutiques **(Foschi** *et al.*, **2016)**.

Les *Lactobacillus* se caractérise généralement par **(Nami** *et al.*, **2014 ; Goldstein** *et al.*, **2015 ; Anila** *et al.*, **2016)** :

- ✓ La résistance aux conditions de tube digestif tel que l'acide et la bile ;
- ✓ La capacité d'adhérence aux cellules épithéliales ;
- ✓ La capacité de coloniser le vagin, ce genre représente 70% de la flore microbien vaginal ;
- ✓ La production des substances antimicrobiennes comme, les bactériocines, l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et des bio surfactants ;
- ✓ Le maintien de l'équilibre de la flore microbienne du vagin par différents mécanismes : l'auto-agrégation et la Co-agrégation avec les microorganismes pathogènes.
- ✓ La production des enzymes fonctionnelles ayant des bienfaits sur la santé humaine tels que, la 6- galactosidase, l'amylase et la protéase.

I.3.1. L'espèce *Lactobacillus plantarum* **:** Elle est considérée comme l'une des bactéries lactiques les plus étudier, c'est une souche mésophile non pathogène, sous forme bâtonnet à Gram positive, aéro-anaérobie facultative, catalase négative, non sporulée, généralement immobile et ses cellules sont souvent organisés en chaines, capable de cultiver à des températures comprises entre 15 et

45°C, une bonne croissance est remarquée en présence de 4 à 6% de NaCl et à des valeurs de pH entre 4 et 9 **(Todorov et Franco, 2010).**

L.plantarum se caractérise par un métabolisme hétéro fermentaire, donc elle est désignée comme *Streptobacterium* ou elle appartient au groupe B, capable de fermenter différents aliments, de ce fait, elle est utilisée comme starter dans la production des aliments fermentés (**Ferrando et** *al*., **2016).**

Les *Lactobacillus* peuvent avoir lieu dans plusieurs niches écologiques, notamment le tractus gastro-intestinal humain et animal, elles sont caractérisées par une grande diversité phénotypique, ce qui justifie les différentes capacités métaboliques des souches pour leur utilisation industrielle (**Ferrando et** *al*., **2016).**

Des travaux ont montré que *L.plantarum* peut produire des substances antimicrobiennes de type bactériocines appelés plantaricines, appartenant aux bactériocines de classe II **(Taale** *et al.*, **2016)**

I.4. Les critères de sélection d'une bactérie probiotique : L'évaluation de l'efficacité des probiotiques, nécessite la compréhension des caractéristiques principales des souches utilisées, dont chaqu'une de ces dernières a ses propriétés uniques et différentes. Pour cela, la sélection et la caractérisation des souches probiotiques est une étape fondamentale et primordiale qui nécessite une gamme des tests *in vitro*, basée sur la détermination de la taxonomie des souches ciblées **(Yepez et Tenea, 2015).**

Une souche potentiellement probiotique doit répond aux critères de sélection suivants **(Tripathi et Giri, 2014) :**

- Les critères de sécurité : qui regroupent ce qui suit :

- ✓ Origine humaine ;
- ✓ non pathogène, non virulente et non toxique ;
- ✓ Activité métabolique dans la matrice alimentaire et dans le tractus gastro-intestinal ensuite ;
- ✓ Propriétés intrinsèques, c'est-à-dire résistance aux antibiotiques.

- Les critères technologiques : les exigences sont les suivantes :

- ✓ Souches stables génétiquement ;
- ✓ La viabilité pendant le traitement et le stockage ;

- ✓ Pas d'effet indésirable sur les propriétés sensorielles du produit ;
- ✓ La possibilité de production à grande échelle ;
- ✓ La résistance aux phages.

- Les critères fonctionnels : qui regroupent :

- ✓ La tolérance à l'acide gastrique ;
- ✓ La tolérance aux acides biliaires ;
- ✓ La capacité d'adhérence à la surface de la muqueuse de l'intestin.

- Les critères physiologiques : qui englobent :

- ✓ Un effet d'immuno modulation ;
- ✓ La possibilité de métaboliser le cholestérol et le lactose ;
- ✓ Avoir des propriétés antimutagènes et anti cancérogènes.

I.5. Les produits probiotiques : Selon **Pandya (2016)**, les probiotiques sont fournis dans les produits par une des formes suivantes :

- ✓ Un concentré de culture ajouté à une boisson ou un aliment (comme les jus de fruits) ;
- ✓ Inoculés en fibres pré-biotiques ;
- ✓ Inoculés dans un aliment à base de lait ;
- ✓ Des produits non laitiers, sous formes de cellules concentrés et séchés ;
- ✓ Comme poudre, capsule, comprimés de gélatines, sachets, gel ou bien pâte.

I.6. Mécanismes d'action des probiotiques : Pour exercer leurs effets, les probiotiques ne colonisent pas toujours directement le tube digestif, cependant, que le passage soit transitoire ou qu'il aboutis à une colonisation, les bactéries probiotiques ont des fonctions à accomplir **(Gogineni** *et al.*, **2013).**

I.6.1.Fonction de barrière : Un grand nombre de composants de la fonction de barrière épithéliale sont influencées par les probiotiques par deux manières différentes, soit par l'augmentation de la production de la mucine ou bien par la diminution du perméabilité intestinale (**Gogineni** *et al.*, **2013).**

I.6.2. Production de substances antimicrobiennes : Les probiotiques interagissent avec les pathogènes et empêchent l'invasion épithéliale, en utilisant deux manières différentes, soit par l'induction des cellules hôtes à la production des peptides, soit par la libération directe des peptides.

Les peptides antimicrobiens, les plus exprimés par les cellules épithéliales intestinales sont les défenismes et les cathélicidines, ces dernières représentent une activité antimicrobienne contre un grand nombre de bactéries, de champignons et certains virus. Il a été démontré que les probiotiques en libérant ces facteurs antimicrobiens bloquent la croissance des pathogènes **(Gogineni** *et al.*, **2013).**

Les probiotiques et plus précisément les *Lactobacillus* exercent l'activité antimicrobienne en utilisant les substances suivantes, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les biosurfactants, les bactériocines…etc (**Stoyancheva** *et al.,* **2014).**

I.6.2.1. Les bactériocines : Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes, incolores et inodores de nature peptidique produites par la plupart des bactéries lactiques tel que les *Lactobacillus,* elles sont également des substances inhibitrices de la prolifération des microorganismes pathogènes, elles montrent habituellement une activité antimicrobienne contre des souches proche à la souche productrice (**Borges** *et al.,* **2014).**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques (BL) sont applicables dans de nombreuses industries **(Perez** *et al.,* **2015; Stoyancheva** *et al.,* **2014).**

I.6.2.2. Les bio surfactants : Les bio surfactants sont des composés actifs synthétisés par divers groupes de microorganismes, ils sont très utilisés dans les différentes industries. Les lactiques probiotiques produisent une gamme de biosurfactants dont les bio-tensioactifs, par exemple peuvent jouer rôle important dans la réduction de la capacité d'adhésion de plusieurs pathogènes **(Satpute** *et al.,* **2016).**

I.6.2.3. Le peroxyde d'hydrogène : Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un agent oxydant, toxique pour les bactéries catalase-négatives telles que la plupart des microorganismes anaérobies. Il est produit par certaines espèces vaginales de *Lactobacillus*, ce qui contribue au maintient de l'équilibre du microbiote vaginale normal **(Borges** *et al.,* **2014 ; Hertzberger** *et al.,* **2014).**

II.6.2.4. L'acide lactique : C'est un acide organique qui est très répondu dans la nature, obtenu par la fermentation homolactique du glucose effectuée par les *Lactobacillu*s. A travers cet acide, les probiotiques arrivent à inhiber les agents d'altération des produits alimentaires. L'acide lactique est considéré également comme un conservateur (**Martinez** *et al.,* **2013)** .

I.6.3.Concurrence pour l'adhésion : L'adhésion bactérienne est initialement basée sur les interactions physiques non spécifiques entre deux surfaces, qui permettent alors des interactions spécifiques entre les adhésines et les récepteurs complémentaires. L'auto-agrégation des souches

probiotiques est nécessaire pour l'adhésion aux cellules épithéliales, et la capacité de co-agrégation présente une barrière qui empêche la colonisation par les flores pathogènes. Les caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire tel que l'hydrophobicité et les charges de la paroi cellulaire peuvent affectés l'auto-agrégation et l'adhésion des microorganismes probiotiques aux différentes surfaces **(Dias** *et al.,* **2013).**

I.7.3. Aptitudes probiotiques : Les souches potentiellement probiotiques sont généralement sélectionnées en se basant sur des propriétés bien distinctes notamment : l'auto-agrégation, co-agrégation avec pathogènes, capacité d'adhérer aux cellules intestinales et l'hydrophobicité de la surface (**Melgar-Lalanne** *et al.,* **2014).**

L'adhésion à la muqueuse intestinale est considérée comme un critère principale de sélection des probiotiques, car elle peut augmenter leur persistance dans l'intestin, ainsi qu'elle permet aux souches probiotiques d'exercer leurs effets bénéfiques. L'adhésion est considérée également comme étape indispensable pour la colonisation du tractus gastro-intestinal **(Garcia-Cayuela** *et al.,* **2014).**

Par ailleurs, l'auto-agrégation est la capacité des bactéries de même souche à former des agrégats cellulaires, la capacité d'agrégation permet aux souches probiotiques d'occuper la surface cellulaire nécessaire pour leur fonctionnalité. La capacité de formation des agrégats cellulaires entre les microorganismes de la même souche explique le rôle protecteur des probiotiques dans le vagin humain. La persistance du probiotique dans l'intestin augmente en raison d'adhésion des agrégats à la surface du muqueuse, ces derniers inhibe la colonisation des pathogènes par camouflage et occupation des sites de fixation (**Tomas** *et al.,* **2005 ; Garcia-Cayuela** *et al.,* **2014).**

L'auto-agrégation est liée principalement à la production de biofilm sur l'épithélium, comme mécanisme de défense contre les pathogènes ce qui empêche leur adhésion aux tissus **(Tomas** *et al.,* **2005).**

Cependant, la co-agrégation est la capacité des probiotiques de co-agréger avec les pathogènes pour empêcher la colonisation de l'intestin par ces derniers, cette aptitude de co-agrégation constitue alors un mécanisme de défense efficace de l'hôte. Le pourcentage de co-agrégation est spécifique de la souche **(Dias** *et al.,* **2013).**

En ce qui concerne l'hydrophobicité, elle mesure l'adhérence des bactéries à certains substrats hydrophobes, donc elle distingue le caractère hydrophile/hydrophobe des cellules bactériennes **(Re** *et al.,***2000).** Ce paramètre varie d'une espèce à l'autre, et selon les facteurs de milieu et l'âge de la bactérie. Généralement les bactéries hydrophobes préfèrent les surfaces hydrophobes et les bactéries

hydrophiles les surfaces hydrophiles, sachant que souvent les bactéries hydrophobes peuvent adhérer mieux que celles hydrophiles **(Baillif** *et al.*, **2010).**

Chapitre II. Les probiotiques dans les aliments fermentés

II.1. Les aliments fermentés : Les aliments fermentés possèdent des propriétés fonctionnelles uniques qui ont le potentiel de moduler des fonctions spécifiques dans le corps et offrent des avantages pour la santé des consommateurs, en raison de la présence de microorganismes bénéfiques **(Tamang** *et al.,* **2016).** Récemment, les consommateurs commencent à considérer les aliments fermentés non seulement comme source d'énergie mais également comme produits de santé **(Enwa, 2014).**

La majorité des produits, contenant les probiotiques sont à base de lait, mais l'intolérance au lactose et le taux de cholestérol sont les principaux inconvénients liés à ces produits, c'est la raison pour laquelle un intérêt grandissant a été donné au développement des produits probiotiques végétals **(Dimitrovski** *et al.,* **2015 ; Liawuangrath** *et al.,* **2015).**

Le développement des aliments fermentés avec des doses adéquates de probiotiques au moment de la consommation est un défi ; les facteurs qui doivent être prise en compte dans l'évaluation de l'efficacité de l'incorporation des souches probiotiques dans les aliments fermentés sont liés à la sécurité et la compatibilité des souches avec le produit, la viabilité des souches dans le produit au cours de traitement et du stockage, la résistance envers les composants du produits, particulièrement, l'oxygène dissous, les additifs alimentaires et le pH du produit **(Tripathi et Giri, 2014).**

II.2. Les jus de légumes lacto-fermentés : La fermentation lactique, représente la méthode la plus simple et la plus appropriée pour la conservation des légumes frais sous leurs formes natives ou sous une autre forme **(Cagno** *et al.,* **2013)**. La fermentation lactique des légumes peut être effectuée par une variétés des bactéries, les plus utilisées appartiennent aux genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* **(Bartkiene** *et al.,* **2016 ; Champagne** *et al.,* **2017).**

La fermentation des légumes enrichie les produits par une haute valeur de protéines d'origine microbienne, réduit la concentration des facteurs antinutritionnels, augmente l'activité antioxydante et généralement améliore les caractéristiques nutritionnelles (**Peres et al,2012).**

Comme modèle de légumes fermenté, le *Cucumis sativus* ou bien, ce qui est nommé le concombre est largement utilisé car, c'est un aliment peu coloré, riche en eau, il est choisi en raison de ces caractéristiques thérapeutiques dont il a un potentiel antidiabétique, une activité

antioxydante ainsi qu'il minimise les lipides et nettoie le corps en suppriment les toxines **(Mukherjee** *et al.*, **2013).**

Le jus de concombre est un liquide peu coloré, à faible teneur en sucre par rapport au jus de fruits et nutritif. Il est devenu une boisson préférable par les populations mondiales grâce a ses effets thérapeutiques tel que les traitements des maladies de gros intestin, ce jus est également recommandé comme source de silice pour l'amélioration de teint et la santé de la peau **(Zhao** *et al.*, **2014; Kumar** *et al.*, **2016).**

II.3. La viabilité des probiotiques dans les jus fermentés : Les probiotiques doivent être viables dans les produits durant toute la période de consommation, ainsi, il a été démontré que la viabilité des microorganismes doit être conservée jusqu'à la date limite de consommation de l'aliment, car les bienfaits désirées des produits probiotiques ne peuvent avoir lieu, si le produit contient un nombre minimum de cellules viables **(Tripathi et Giri, 2014 ; Sarkar** *et al.*, **2016)**. Afin de répondre à cette exigence, l'industrie alimentaire a adopté le niveau minimum recommandé en probiotiques dans les jus, 10^6- 10^7 UFC/ ml au moment de la consommation **(Nualkaekul** *et al*,**2013).**

Sur la base des données cliniques, selon la quantité ingérée et en prenant en considération l'effet du stockage sur la viabilité des probiotiques, il est nécessaire qu'un nombre de 10^8 – 10^9 cellules viables doit atteindre le tractus gastro-intestinal pour permettre le bon fonctionnement de ces segments intestinaux **(Sarkar** *et al.*, **2016).**

II.4.La survie des probiotiques dans les aliments fermentés : L'efficacité médicale des produits fermentés à probiotiques dépend du nombre de cellules viables et actives par gramme ou millilitre de produit au moment de la consommation, donc, afin que les consommateurs aient toujours confiance en ses produits probiotiques, il est nécessaire de maintenir un taux élevé de survie de probiotiques dans le produit et ce le long de la chaine de production, de stockage et de la commercialisation **(Tripathi et Giri, 2014).**

Nombreux facteurs peuvent influencer la viabilité des microorganismes probiotiques dans les produits fermentés, et cela du processus de fabrication jusqu'au stockage, et selon **(Tripathi et Giri, 2014)** il s'agit de:

- ✓ Les paramètres liés aux produits : pH, acidité, l'oxygène moléculaire, activité de l'eau, présence de sel, peroxyde d'hydrogène, bactériocines, additifs alimentaires ;
- ✓ Les paramètres de traitement : traitement thermique, la température d'incubation, vitesse de refroidissement du produit, matériaux d'emballage, méthodede stockage et l'échelle de production ;
- ✓ Les paramètres microbiologiques : la souche probiotique, le taux et la proportion d'inoculation**.**

II.4.1. La survie pendant le processus de fabrication

II.4.1.1. La température de fermentation : C'est un facteur très important qui influence la viabilité des microorganismes probiotiques. La température optimale de la croissance des probiotiques se situe dans la gamme de 37- 43°C **(Tripathi et Giri, 2014).**

Parmi les facteurs, l'oxygène contribue également à la diminution de la viabilité des probiotiques anaérobies lors de la fermentation. Pour éviter ce problème, certains scientifiques ont proposé l'accomplissement de la fermentation sous vide. De même, le stress thermique a des effets néfastes sur la survie et de ce fait, lors des tests de sélection des probiotiques, tous ses paramètres doivent être pris en considération **(Tripathi et Giri, 2014).**

II.4.1.2.La congélation: Les probiotiques peuvent survivre dans les légumes congelés mais pas pour longtemps car des cristaux de glace se forment dans le milieu externe ou a l'intérieur des cellules provoquant des dommages au niveau des membranes cellulaires. Aussi lors de la congélation, il y à une déshydratation du milieu extra-et intracellulaire, ce qui conduit à une diminution des activités métaboliques **(Perricone** *el al***,2015).**

II.4.1.3. Le séchage et la déshydratation : Afin d'augmenter la durée de la conservation à des températures ambiantes et afin de réduire le cout de stockage, les aliments probiotiques peuvent être présentés sous une forme sèche. Cependant, ce traitement provoque une perte de la viabilité des souches **(Tripathi et Giri, 2014).**

Les conditions de déshydratation influencent sur le taux de récupération des probiotiques à l'état viable. La température utilisée est un facteur critique qui conditionne le nombre de cellules récupéré dans le produit lyophilisé. Il a été montré qu'il n'y à pas une température précise pour la déshydratation, elle dépond du microorganisme. La réussite de la

déshydratation, permettra une revivification des cellules (bonne viabilité) lors de la réhydratation avant la consommation **(Tripathi et Giri, 2014).**

II.4.2. La survie pendant le stockage : La composition de l'aliment, les types de matériaux d'emballage et l'environnement de stockage ont des influences importantes sur la survie des probiotiques pendant la conservation **(Perricone** *el al***,2015) :**

II.4.2.1. Ingrédients et additifs alimentaires : Les ingrédients dans les aliments peuvent être protecteurs, neutres ou nuisibles à la stabilité des probiotiques, d'où la compatibilité des probiotiques avec les différents ingrédients alimentaires a le rôle majeur dans leur survie. Les additifs alimentaires majeurs de l'industrie alimentaire sont des sucres, sels, composés aromatiques et colorants. Ces additifs pourraient affecter de façon drastique la croissance et la viabilité des bactéries probiotiques utilisés pour les produits fermentés **(Tripathi et Giri, 2014).**

II.4.2.2. La teneur en oxygène et le potentiel redox : La teneur en oxygène et le potentiel redox sont parmi les facteurs qui influencent la survie du probiotique pendant la période de stockage. L'oxygène moléculaire est un paramètre néfaste pour la survie et la croissance des probiotiques en raison de l'anaérobiose des espèces mais la sensibilité des espèces probiotiques à l'oxygène diffère selon la souche en question

. Ainsi, pendant la période de stockage des produits probiotiques, le niveau d'oxygène devrait être aussi faible que possible, afin d'éviter la toxicité et la mort des cellules et par conséquent, la perte de la fonctionnalité du produit **(Perricone** *el al***,2015).**

II.4.2.3. Taux d'humidité / activité de l'eau : La teneur en humidité est un autre facteur qui affecte la viabilité des bactéries dans les produits probiotiques, car le stockage en présence d'oxygène et humidité était préjudiciable à la survie des microorganismes. La quantité d'eau restante après séchage affecte la viabilité des bactéries comme elle est déterminante de la qualité du produit durant toute la période de stockage **(Tripathi et Giri, 2014).**

II.4.2.4. Température de stockage : Comme toute relation proportionnelle, la viabilité des bactéries probiotiques pendant le stockage est inversement lié à la température de stockage.

Les aliments probiotiques doivent être conservés de préférence à une température de **4 à 5 °C (Tripathi et Giri, 2014).**

II.4.2.5. pH et acidité: La survie des probiotiques pendant le stockage est considérablement affecté par le pH et l'acidité titrable des produits, dont une très faible valeur du pH augmente la concentration des acides organiques non dissociées dans les produits fermentés **(Perricone** *el al*,**2015)**

II.4.2.6. Aspects de l'emballage : Différents types d'emballage peuvent affecter la survie des probiotiques dans leurs produits. On peut citer, l'épaisseur de l'emballage, sa perméabilité à la lumière, la technique d'emballage ainsi que les gaz (O_2, CO_2 et vapeur d'eau). De même, la température et l'humidité relative de l'atmosphère peuvent affecter la perméabilité de l'emballage aux gaz, ce qui conduit à un effet directe sur la viabilité des probiotiques **(Tripathi et Giri, 2014).**

Etude expérimentale

II.1. Matériel : La réalisation de notre travail à lieu aux laboratoires de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Jijel.

II.1.1 Matériel biologique : Le matériel biologique utilisé pour effectuer ce travail est le suivant :

- ✓ **La souche bactérienne :** il s'agit d'une bactérie lactique, *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*) isolée du lait de chèvre locale isolé par **Dr Khennouf**.
- ✓ **Concombre et jus de concombre :** Le concombre a été acheté du marché de Jijel, la quantité utilisée est de 4 kg. Elle a servie pour la préparation de jus de concombre.
- ✓ **Les cellules épithéliales :** Elles ont été préparées à partir de l'intestin d'un poulet d e chair, elles ont été utilisées pour réaliser le test d'adhésion.

II.1.2. Les milieux de culture : Les milieux de cultures cités ci-dessous ont été utilisés pour la réalisation de la partie microbiologique de notre travail :

- ✓ **Gélose nutritive :** pour le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) ;
- ✓ **Gélose OGA (Oxytétracycline-Glucose-Agar) :** pour la recherche et le dénombrement des levures et moisissures ;
- ✓ **Bouillon MRS :** pour la mise en culture de notre souche lactiques (repiquage), ainsi que pour la réalisation des tests ;
- ✓ **Bouillon LB (Luria-Bertoni) :** pour la mise en culture des souches pathogènes pour le test de Co-agrégation,

II.1.3 Produits chimiques et réactifs : L'ensemble des tests réalisés ont nécessité ce qui suit :

- **Colorants :** cristal violet, violet de Gentiane, lugol et fushine.
- **Produits chimiques :**
  - ✓ NaOH 1N, phénophtaléine (pour la détermination de l'acidité) ;
  - ✓ Xylène, toluène, chloroforme et éthyle acétate (pour le test d'hydrophobicité) ;
  - ✓ Empois d'amidon, di-iode (0.05 mol/l) (pour la titration de la vitamine c) ;
  - ✓ Follin-Ciocalteu, carbonate de sodium (7.5%) (pour la détermination des polyphénols) ;
  - ✓ Réactif de tashiro, sulfate de cuivre, sulfate de potassium, acide borique, et l'acide sufurique 0.1N (pour le dosage de l'azote) ;
  - ✓ Acide chlorhydrique et l'acide nitrique (pour la mise en solution des cendres) ;
  - ✓ Acide ascorbique (pour la réalisation de la courbe d'étalonnage) ;
  - ✓ Phénol à 80%, acide sulfurique concentré 95% (pour la détermination des sucres totaux) ;
  - ✓ Les sels biliaires (pour le test de la tolérance aux sels biliaires) ;
  - ✓ Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (pur le dosage des flavonoïdes).

- **Tampons :**
  - ✓ Tampon PBS "tampon phosphate salin" pH=7.2, préparé au laboratoire pour lavage et conservation des cellules ;
  - ✓ Tampon phosphate urée magnésium pH=7.1, préparé au laboratoire pour le test d'hydrophobicité.

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification de la souche: cette étape consiste à relancer et cultiver la souche de *L. plantarum* sur milieu Man- Rogosa-Sharp (MRS). La souche qui a été précédemment conservée à -20°C dans le bouillon MRS contenant 20% de glycérol a été revivifiée par ensemencement dans le bouillon MRS suivi d'une incubation à 30°C pendant 48 heures. La pureté de la souche est vérifiée par observation microscopique après coloration de Gram **(Kareem** *et al.,* **2014).**

II.2.2. Fabrication du jus de concombre et fermentation : Le jus de concombre fermenté a été préparé selon la méthode décrite par **Breidt et Caldwell (2011) :**

II.2.2.1. Préparation de jus de concombre : 4 Kg de concombre ont été bien lavés et épluchés, puis coupés en petites morceaux, ensuite broyés et mixés, le produit ainsi obtenu est additionné de l'eau et congelé pendant une nuit, une fois la congélation terminée, il est décongelé puis centrifugé, le jus de concombre est récupéré par filtration et mis dans des flacons stériles (**figure 01).**

II.2.2.2. Préparation de jus de concombre lacto-fermenté : La méthode utilisé dans notre expérience est celle décrite par **Breidt et Caldwell (2011)** avec des modifications mineures. Chaque flacon de jus de concombre déjà préparé a été ensemencé à raison de 5% par la souche lactique *L.plantarum*, ensuite la fermentation a été faite au bain Marie agitateur à 37°C pendant 6 heures. La figure ci-dessous illustre les étapes de la préparation de jus de concombre lactofermenté.

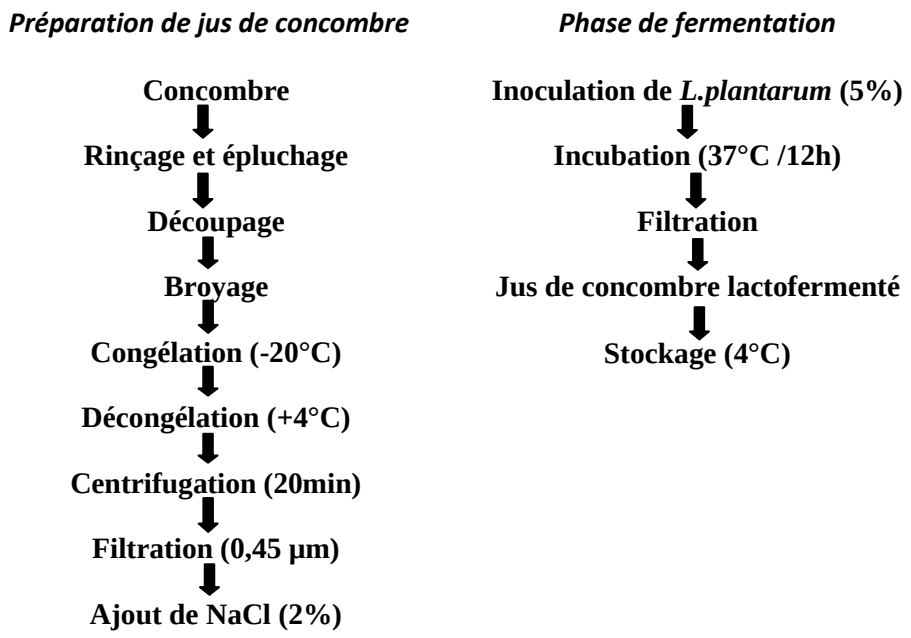


Figure 01 : Diagramme de la préparation du jus de concombre lactofermenté **(Breidt et Caldwell, 2011)**

II.2.3. Contrôle de quelques paramètres physico-chimiques du jus de concombre brut : Dans le but d'avoir une idée sur la composition biochimique de notre jus de concombre comme matière première, l'ensemble des paramètres physico-chimiques suivants ont été évalués pour le jus brut, produit fini et celui conservé 5, 10 et 15 jours:

II.2.3.1. Dosage de la vitamine C (titrage direct) : Un volume de 10 ml de jus de concombre a été versé dans un bécher et titré par la solution de di-iode à 0.05mol/l en présence d'une pointe d'empois d'amidon. Le point final de la titration est identifié comme la première trace d'une couleur bleu-noire foncée résultant de la formation du complexe amidon-iode **(Belguedj, 2002).**

La teneur en vitamine C est exprimée en g/l par la formule suivante :

$$[\text{Vit C}] = \frac{T.V.176}{2E}$$

Avec :

T : Titre de la solution di-iode (0.05mol/l).

V : Volume d'iode utilisé.

E : prise d'essai (10 ml).

176 : le poids moléculaire de l'acide ascorbique.

II.2.3.2. Détermination de la teneur en protéine (Kjeldahl, 1883) : Afin de déterminer la quantité en protéines dans notre jus de concombre avant et après conservation, nous avons procédé à un dosage de l'azote total qui passe par les étapes suivantes :

- ✓ **Minéralisation :** Dans un matras de l'appareil **Kjeldahl**, on introduit 2g de jus de concombre avec 2g de catalyseur (mélange de 20g de sulfate de cuivre et sulfate de potassium), 25 ml de H_2SO_4 concentré (97%) et 2 ml d'eau oxygénée à 30%. Le matras est ensuite chauffé jusqu'à ce que la couleur noire se transforme en une couleur limpide, ce qui indique la transformation de l'azote organique en azote minéral. Ensuite on laisse refroidir et on traverse l'échantillon minéralisé dans une fiole, on lave le matras avec l'eau distillée tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.

- ✓ **Distillation et titration :** dans un matras, on introduit 10 ml du contenu de la fiole auquel on additionne 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude à 35%. En parallèle, on prépare une solution d'acide borique à 0,1N avec quelques gouttes d'indicateur de Tashiro. La distillation est arrêtée au bout de 4 minutes à compter du début d'ébullition.

  En raison de l'utilisation de l'acide borique comme solution de récupération, on va alors titrer l'excès des anions de borate avec la solution d'acide sulfurique (0,1N) jusqu'au changement de la coloration du vert au rose-violet du au virage de l'indicateur de Tashiro. L'azote total est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\textbf{Azote total (N) (\%)} = \frac{(VB-VE).0.0014.10.100}{M}$$

Sachant que :

VB : volume d'H_2SO_4 0.1N utilisé pour un essai blanc.

VE : volume de H_2SO_4 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 :

Taux de protéines brutes (%) = N total (%) x 6.25

Avec :

6.25 : est le facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

II.2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche (MS) : Dans des creusets de porcelaine préalablement tarés, 10g de jus de concombre ont été pesés, puis les creusets ont été placés dans l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Les résultats sont exprimés de la manière suivante **(Lecoq, 1965) :**

$$\mathbf{MS(\%)} = [\mathbf{X/Y}] \times \mathbf{100}$$

Avec :

MS : matière sèche.

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage.

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

II.2.3.4.Détermination de la teneur en matière minérale (MM) : Dans des creusets déjà bien nettoyé, séché et taré, 10 g de jus de concombre ont été pesés puis placés dans le four à moufle à 550°C jusqu'à l'apparition d'une couleur grise à blanche, c'est la couleur caractéristique des cendres. Le pourcentage de la matière minérale est déterminé par la formule suivante **(AOAC, 2000) :**

$$\mathbf{MM(\%)} = [\mathbf{X/Y}] \times \mathbf{100}$$

Avec :

MM : matière minérale.

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage.

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

II.2.3.5.Détermination du taux des sucres totaux : La méthode appliquée dans ce test est celle décrite par **Dubois** *et al.***(1956) :** 2 ml de jus de concombre ont été introduit dans des tubes à essai stérile, puis un volume de 0.05ml de phénol à 80% a été additionné, ensuite 3ml d'acide sulfurique concentré (96%) sont ajoutés rapidement en évidant de le verser contre les parois, le mélange obtenu a été bien homogénéisée à l'aide d'un vortex puis incubé au bain Marie à 30°C pendant 30min, ensuite les tube sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30min. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 490nm. La concentration en sucres totaux

a été déterminée par référence à la courbe d'étalonnage obtenue (annexe 6), sachant que le glucose a été utilisé comme solution standard d'étalonnage.

La teneur en sucres totaux est exprimée en fonction du glucose :

$$ST = [(X .V. D/P)] \times 100$$

Avec:

ST : Taux de sucres totaux (%).

X : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

D : Facteur de dilution.

V : Volume de la solution analysée (ml).

P : poids de la prise d'essai(g).

II.2.3.6.Détermination du degré Brix : Le Brix (%) exprime le pourcentage de la concentration des solides solubles (TSS) contenus dans un échantillon (solution aqueuse). Le contenu des solides solubles représente l'ensemble des sucres, sels, protéines, acides… etc, solubles dans l'eau.

En utilisant un refractomètre à main, le totale des solides solubles dans l'eau est déterminé ; 1 ml de l'échantillon à tester est mis dans le puis de refractomètre et analysé à 25°C, deux zones apparaissent, la valeur entre eux est celle à noter comme degré Brix **(Khandpur et Gogate, 2016).**

II.2.3.7.Détermination de la teneur en métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique : La méthode utilisée est celle décrite par **Khlifa** *et al.* **(2013),** dans un tube contenant 1 ml d'acide chlorhydrique, les cendres obtenus ont été dissoutes puis additionnés de 10 ml d'eau distillée. La solution obtenue est chauffée pour quelques minutes au bain-Marie jusqu'à dissolution complète des cendres. La solution obtenue est ensuite versée dans une fiole de 100 ml et le volume est complété jusqu'à la jauge avec l'eau distillée.

Le dosage de cuivre et zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique a été effectué a partir de la solution obtenue.

II.2.3.8. Dosage de potassium, calcium et de sodium par spectrophotométrie à flamme : Les échantillons de jus ont été calcinés suivi d'une dissolution de leurs cendres dans l'acide nitrique, la détermination de la teneur des trois éléments minéraux obtenus dans l'extrait minéralisé s'est effectuée par spectrophotométrie à flamme **(Pauwels et *al*., 1992).**
Les taux de potassium, calcium et de sodium des trois échantillons sont déterminés à partir des courbes étalons.

II.2.3.8.Dosage des phénols totaux : La teneur en phénols dans le jus de concombre a été déterminée suivant la méthode décrite par **Talbi** *et al.* **(2015),** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Dans des tubes à essai stériles, un volume de 200µl de jus de concombre a été introduit, ensuite le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Le mélange obtenu est agité et laissé à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance a été mesurée à 765 nm.

La quantité de phénols est calculée en se basant sur la courbe d'étalonnage ou l'acide gallique est utilisé comme standard.

II.2.3.9.Dosage des flavonoïdes : Pour la détermination des flavonoïdes dans le jus de concombre, la méthode du trichlorure d'aluminium décrit par **Talbi** *et al.* **(2015)** a été appliquée. Dans un tube à essai, 1 ml de l'échantillon est ajouté à 1 ml de la solution d'$AlCl_3$, après 10 minutes d'incubation à température ambiante, la DO est mesuré à 415nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'échantillon.

II.2.4. Contrôle de jus de concombre lacto-fermenté : Durant la fermentation de notre échantillon, nous avons procédé à un contrôle et suivis de cinq paramètres à savoir, le pH, l'acidité, la viscosité, l'absorbance (DO) et le nombre de cellules viables et cela :

- ✓ Au cours de la fermentation à T_{0h} (lors de l'ensemencement) et après chaque deux heures de fermentation (T_{2h}, T_{4h}, T_{6h}, T_{8h}, T_{10h} et T_{12h}).
- ✓ Au cours de stockage à 4°C après 5 jours, 10 jours et 15 jours (T_{5j}, T_{10j} et T_{15j}).

II.2.4.1.Le pH : Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre à électrode, la mesure a été réalisée, en plongeant l'électrode du pH mètre dans un volume de 20 ml de jus de concombre **(AOAC, 2000)**, la valeur qui apparaisse sur le pH mètre va être notée.

II.2.4.2. L'acidité titrable : L'acidité titrable a été déterminée à l'aide de la méthode de la titration générale, en se référant au volume de NaOH (0.1N) utilisé pour titrer 10 ml de l'échantillon en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine. La couleur doit persister au moins quelques secondes **(Idoui** *et al.,* **2009).**

L'acidité est donnée par la formule suivante :

$$\textbf{Acidité °D} = V_{NaOH} \times 10$$

V_{NaOH} **:** volume de la soude utilisé pour titrer l'acide lactique dans 10 ml de lait.

II.2.4.3 Etude de la cinétique de croissance: La densité optique (DO) du jus est mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 620 nm, la valeur affichée sur l'écran du spectrophotomètre est noté comme DO **(Kareem** *et al.,* **2014).**

II.2.4.4. La densité : La densité est déterminée par la formule physique connue : densité = $\frac{poids}{volume}$. Après chaque 2 heures de fermentation, un volume de 30 ml est prélevé et le poids équivalent est noté pour effectuer les calcules (**Mousavizadeh** *et al.,***2010)** .

Il est a signalé que les paramètres évalués pour le jus brut ont été suivis lors au cours du stockage, en utilisant les mêmes techniques.

II.2.4.5. Le comptage des cellules viables : La méthode utilisée pour le comptage de cellules viables au cours de la fermentation est celle décrite par **Sadok** *et al.* **(2015)** et qui comporte les trois étapes suivantes :

- ✓ **Préparation des microdilutions :** Sur une microplaque et à l'aide d'une micropipette 900µl ont été pris et mis dans les micro-tubes de la plaque et ensuite compléter par 100 µl de l'échantillon comme première dilution ; les dilutions successives ont été poussées jusqu'à 10^{-9}.
- ✓ **Préparation de la cellule de Malassez :** La cellule a été d'abord nettoyée, ainsi que la lamelle avec de l'alcool puis le tout a été séché, par la suite, la lamelle a été mise en place. Enfin, un volume de 50 µl de l'échantillon a été prélevé da façon où la chambre de notre cellule Malassez doit être remplit par capillarité en touchant le bord de la lamelle avec l'extrémité de la cellule.
- ✓ **L'observation microscopique :** l'observation a été faite à l'objectif 40 où les cellules viables ont été dénombrées.

Le nombre de cellules viables est calculé comme suite :

$$\textbf{Nombre de cellules} = Ng.100.10^{3}.\ 1/Z$$

Avec :

Ng : moyen de cellules comptées sous microscope.

Z : la dilution utilisée.

II.2.4.6.Contrôle microbiologique

II.2.4.6.1. Préparation des dilutions décimales : en utilisant une pipette stérile, 1 ml de jus de concombre est transféré dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, cela est considéré comme dilution 10^{-1}, à partir de cette dernière, on refait la même opération pour aboutir à la dilution 10^{-6}.

II.2.4.6.2. Recherche et dénombrement des levures et moisissures : Le dénombrement est réalisé en utilisant la gélose OGA préalablement coulée et solidifiée. 1 ml de la dilution 10^{-3} est étalé en surface du milieu ensuite les boites ont été incubées pendant 3jours à la température de laboratoire. Après incubation, toutes les colonies blanches sphériques et filamenteuses ont été dénombrés **(Idoui, 2013).**

II.2.4.6.3.Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) : L'ensemencement est effectué en étalant en double 1 ml de la dilution 10^{-6} en surface de la gélose nutritive préalablement coulée et solidifiée. Après 24 h d'incubation à 37°C toutes les colonies lenticulaires ont été dénombrées **(Guiraud et Rosec, 2004).**

II.2.5. Evaluation de l'effet matrice alimentaire et conservation sur les aptitudes probiotiques de *L.plantarum*

II.2.5.1. Ré-isolement de l'espèce *L.plantarum*: En se basant sur les résultats précédents, notre jus de concombre fermenté pour 6 heures est considéré comme produits fini. Des échantillons de ce derniers ont été conservés à 4°C pendant 5j, 10j et 15 jours.

Pour évaluer l'effet de la matrice alimentaire (jus de concombre fermenté), puis l'effet combiné matrice alimentaire- conservation, sur les performances probiotiques de notre souche, nous l'avons ré- isolé à partir des échantillons de 6h de fermentation, 5, 10 et 15 jours de conservation. Pour se faire, un volume de chaque échantillon a été centrifugé 5 minutes à 6000rpm et le culot bactérien a été récupéré dans du PBS. Une culture sur Bouillon MRS a été préparée dans les mêmes conditions que le jus de concombre fermenté (5%) et elle a servi comme témoin.

La masse cellulaire récupérée dans le PBS a servi pour les tests suivants :

II.2.5.2. Test d'hydrophobicité: L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Bouridane** *et al.* **(2016):** Le culot bactérien de la culture jeune a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm/5min suivie de deux lavages successifs par le PBS puis ré-suspendu 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, toluène et éthyle acétate ont été ajoutés doucement à 3 ml 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 considéré comme le pourcentage l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) déterminée par l'équation suivante:

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

II.2.5.3. Adhésion *in vitro* **au tissu épithélial :** Dans le but d'évaluer la capacité de notre souche probiotique *L.plantarum* 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, laver 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^{-4}, 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 $5x10^4$ cellules/ml.

Préparation des cellules bactériennes: pour récupérer les cellules bactériennes, un volume de jus de concombre lacto-fermenté a été mis dans des tubes stériles puis centrifuger à 6000 rpm/10min, le culot obtenu a été incubé dans le bouillon MRS pendant 18h, ensuite les cellules bactériennes jeunes ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm/10min. Le culot

a été repris dans 2 ml du PBS suivis d'une observation microscopique (x100) pour confirmer que le nombre est approximativement de 10^8 cellules/ml**.**

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

II.2.5.4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation: La capacité d'une cellule à former des agrégats avec des cellules de même souche ou cellules différentes est appelé auto-agrégation et co-agrégation respectivement.

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, une agitation de 10 secondes a été procédé, ensuite après incubation de la suspension à 37°C pour 4 heures , l'absorbance est déterminé 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 :

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

Avec :

$\mathbf{A_t}$: DO à t heures d'incubation.

$\mathbf{A_0}$: DO à t_0.

Pour la co-agrégation, la suspension cellulaire de notre souche a été préparée de la même manière que le test d'auto-agrégation. Les suspensions bactériennes de *E .coli*, S.aureus, *B.subtilus* ont été préparées sur bouillon LB, pour chaque souche, une colonie est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile et ensemencée dans des tubes stériles contenant le bouillon LB, ensuite les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures 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 secondes. Après une incubation de 4 heures 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 :

$$\textbf{Co-aggregation (\%)} = \frac{[(A\ lactobacillus + A\ pathogène)] - Amix\ X100}{Alactobacillus + Apathogène}$$

II.2.5.5. Résistance aux sels biliaires: La méthode utilisée pour réalisé 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 la souche aux sels biliaires a été estimée par une mesure de la densité optique à 620 nm.

Le taux de la survie de *L.plantarum* a été déterminé par la formule suivante :

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

Avec :

DO_1 : la densité optique du témoin.

DO_2 : la densité optique de tube à 0.3% sels.

En plus de la mesure de la DO, le nombre de cellules est compté à partir de la dilution 10^{-9} en utilisant la cellule de Malassez.

II.2.5.6. 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 (pH2, pH3, pH4 et pH5,8).10ml de chaque bouillon ont été introduit dans des tubes stériles dont chaque tube reçoit 1 ml de la culture jeune. Le tous est incubés 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 :

$$\textbf{\% survie} = \mathbf{DO_{MRS\ ajusté\ (pH\ 2,3,4)}} \ / \ \mathbf{DO_{MRS\ à\ pH\ 5.8}} \ \mathbf{x\ 100}$$

En plus de la mesure de la DO, le nombre de cellules est compté à partir de la dilution 10^{-9} en utilisant la cellule de Malassez.

Résultats et discussion

III.1. Evolution des paramètres physicochimiques du jus de concombre au cours de la fermentation et la conservation à 4°C

III.1.1.Evolution du pH et de l'acidité: Avant de précéder à la fermentation, le jus de concombre frais à un pH de 6.56. Ce résultat se concorde est celui obtenu par **Tyagi** *et al.* **(2016)**, ces auteurs ont réalisé une étude sur le même produit et ils ont obtenu pour le produit brut, le jus de concombre frais, un pH de 6.10.

Cependant après ensemencement du jus de concombre brut par la souche *L.plantarum*, nous remarquons une diminution progressive des valeurs du pH au cours de la fermentation. La **figure 02** résume l'évolution du pH et de l'acidité de jus de concombre lacto-fermenté.

Après ensemencement du jus par la souche *L.plantarum*, le pH diminue progressivement à 5.14 au moment de l'ensemencement, ensuite au cours des heures de fermentation on remarque un abaissement progressif de la valeur du pH jusqu'à atteindre une valeur de 3.68 après 12 heures de fermentation. Cette chute de pH est le fait du métabolisme des composants de jus de concombre par notre souche qui a pu convertir ces derniers en acides organiques qui agissent directement sur le potentiel hydrogène du produit. De même, il est bien établi que les bactéries lactiques produisent principalement de l'acide lactique lors de la fermentation, ce dernier étant un des conservateurs naturels des produits alimentaires fermentés.

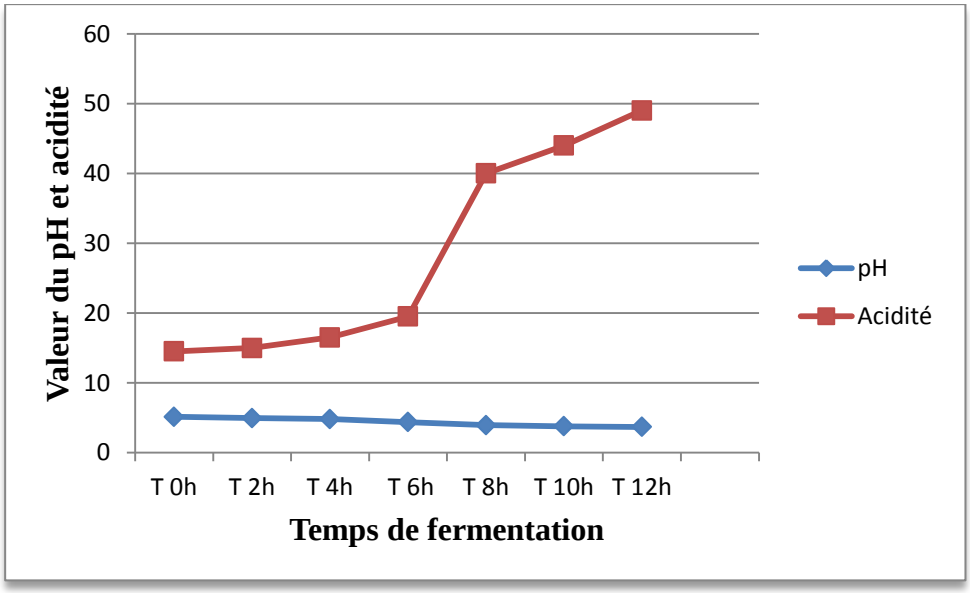


Figure 02 : Evolution du pH et de l'acidité au cours de la fermentation du jus de concombre.

L'étude menée par **Lavinia** *et al.* **(2012)** a donné des résultats compatibles aux notre, cette étude a été réalisée sur le même produit, le jus de concombre avec une souche de même genre *L.acidophilus* où le pH a diminué de 6.21 à pH 2.51, après 24 heures d'incubation.

Les résultats de l'étude menée par **Sharma** *et al.* **(2013),** ainsi que celle réalisée par **Nosrati** *et al.* **(2014),** ont montré que la valeur du pH diminue au cours de la fermentation de jus de légumes, ce changement du pH est due à la production de l'acide lactique.

En ce qui concerne l'acidité du produit, d'après les résultats de la **figure 02,** nous constatons que l'acidité de jus de concombre lacto-fermenté augmente progressivement au cours de la fermentation pour atteindre la valeur de 49°D après 10 heures d'incubation. Cependant, elle s'est stabilisée après les 10 heures de fermentation, ceci est probablement liée à l'auto-inhibition de la souche par les métabolites de fermentation.

Les résultats de l'étude menée par **Lavinia** *et al.* **(2012)** ont montré que l'acidité de jus de concombre augmente au cours de la fermentation jusqu'à atteindre 12.69°D, après 24 heures d'incubation. Cette valeur est strictement inférieure à la notre, ce qui nous laisse supposer que notre *L.plantarum* a un statut fermentaire incomparable à celui des souches utilisées par ces auteurs.

Par ailleurs, d'après **Lavinia** *et al.* **(2012),** il y à une corrélation entre la diminution du pH et l'augmentation de l'acidité, ce qui explique les résultats illustrés dans la **figure 02**.

Cependant, après conservation de jus de concombre dans le réfrigérateur à 4°C, le pH des échantillons a été évalué après 5 jours, 10 jours et 15 jours de conservation et les résultats sont illustrés par la **figure 03**. D'après ces résultats, nous constatons une diminution progressive du pH de jus de concombre au cours de stockage de conservation dont les pH étaient respectivement de pH 3.47 (5jours), pH 3.07 (10jours) et pH 3.03 (15jours). Ces résultats témoignent que le métabolisme fermentaire n'est pas totalement inhibé par l'abaissement de la température.

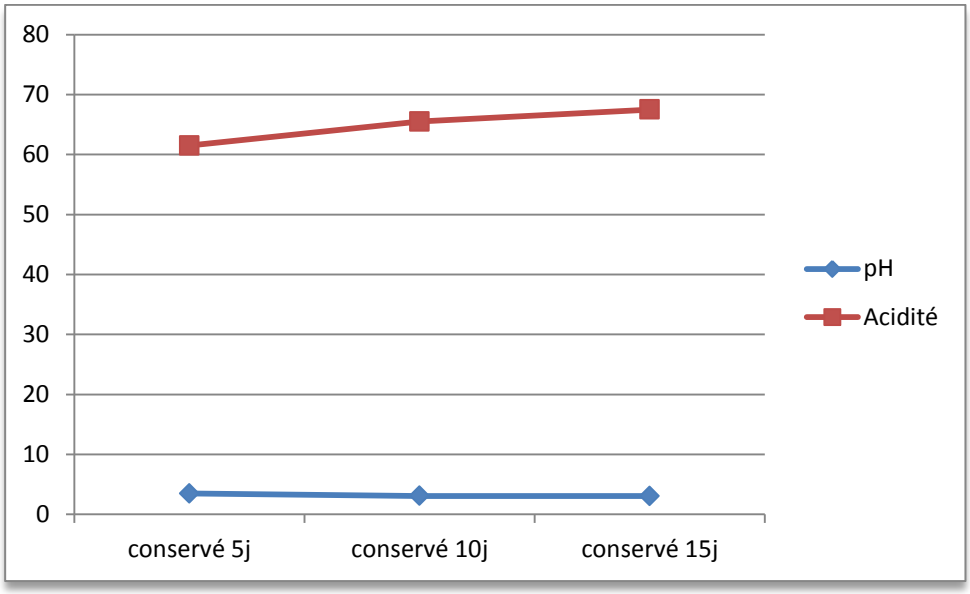


Figure 03 : Evolution du pH et de l'acidité de jus de concombre au cours de la conservation.

Notre résultat du pH se concorde et celui obtenu par **Nosrati** *et al.* **(2014)** qui ont trouvé dans leur étude qu'il y à une diminution du pH de jus de concombre lacto-fermenté par *L.casei* et *L.plantarum* au cours de la conservation du produit, ce dernier a atteint un pH de 3.7.

L'acidité est également suivie au cours de la conservation, les résultats obtenus sont illustrés par la **figure 03**. D'après les résultats de cette figure, il apparait que la conservation au froid n'affect pas le métabolisme des souches probiotiques du genre *Lactobacillus* dont il y à une bonne production d'acide lactique, même après 15 jours de conservation du jus. En fin de conservation, l'acidité a atteint 67.5°D.

III.1.2.Evolution de cinétique de croissance: Au cours de la fermentation et de la conservation, ce paramètre a été suivi à l'aide du spectrophotomètre UV-Visible et les résultats sont illustrés par la **figure 04.**

On remarque qu'il y à une augmentation de la densité au cours de la fermentation. Au moment de l'ensemencement du jus de concombre, elle était de 0.4, cependant, après les deux premières heures de fermentation, elle a connu une augmentation très remarquable pour atteindre une valeur de 1.27. Au delà de 2h d'incubation, ce paramètre a connu une évolution graduelle pour atteindre en phase finale de fermentation une valeur de 1.89. Cette courbe est représentative de l'évolution de biomasse dans le produit au cours de la fermentation et on peut considérer cette comme étant une courbe de croissance de notre souche.

Cependant, après la conservation du jus, la cinétique de croissance a été évaluée de la même manière après 5 jours, 10 jours et 15 jours de conservation**.** Les résultats de la **figure 05,** montrent que comparativement à ceux du produit fini (fin de fermentation), les valeurs de la densité sont strictement inférieures à 1.89, densité du produit en fin de fermentation. Au cours de la conservation au froid, les densités obtenues sont respectivement de 0.96, 0.98 et 1.44, valeurs correspondantes aux 5^{éme}, 10eme et 15eme jours de conservation. Cela dit, il est a constaté, qu'il y a une évolution de ce paramètre en fin de conservation et cela pourrait être lié à une dégénérescence des cellules accompagnée d'une dégradation des nutriments du produit.

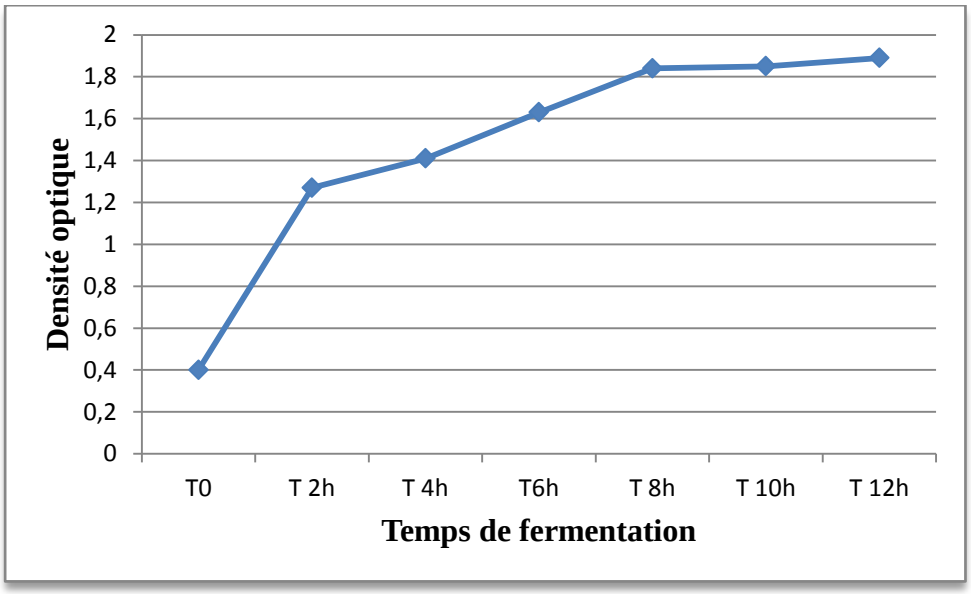


Figure 04 : Evolution de la cinétique de croissance au cours de la fermentation.

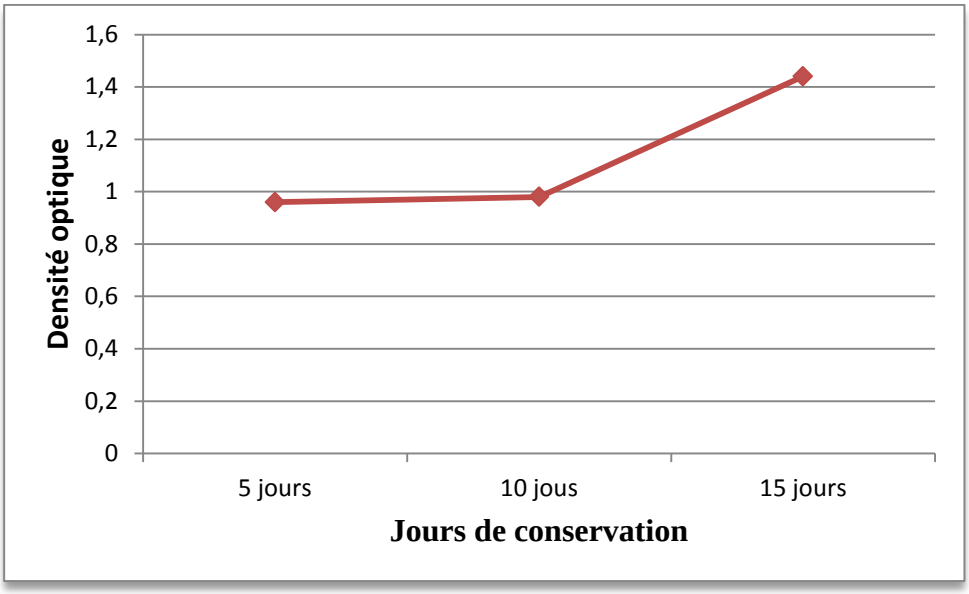


Figure 05 : Evolution de la cinétique de croissance au cours de la conservation.

III.1.3.Evolution de la densité: Au cours de la fermentation, la densité a été mesurée chaque deux heures et les résultats sont illustrés par la **figure 06**.

On remarque que la densité de notre jus de concombre diminue petit à petit à partir des deux premières heures de la fermentation à 37°C. Nous avons démarré avec un jus à densité initiale de 0.87 g/cm^3, après six heures de fermentation, ce paramètre a chuté pour atteindre une valeur de 0.82 g/cm^3, cette densité a été identique à 8h et 10 h de fermentation. Au-delà de 10h, nous avons remarque une chute de la densité, c'est-à-dire que notre jus est devenu plus fluide, pour aboutir en fin de fermentation à une densité de 0.78 g/cm^3.

Après la conservation de jus, la mesure de la densité a été suivie après 5jours, 10 jours et 15 jours de conservation. Les résultats de la **figure 07** montrent clairement que l'effet inverse a été observé au cours de la conservation au froid dont la densité de jus de concombre a connu une augmentation après les cinq premiers jours de conservation pour atteindre une valeur de 0.9 g/cm^3, cette densité est supérieur à celle du produit brut, c'est à dire, il y à eu une perte de l'aspect fluide du jus. Au-delà du 10^{éme} jours, nous assistons encore une fois à une diminution de la densité pour atteindre après 15 jours de conservation, une valeur de 0.81 g/cm^3. Cela ne peut s'expliquer que par une reprise de l'activité de certaines enzymes hydrolytiques probablement produites par la souche, ou encore une altération du produit.

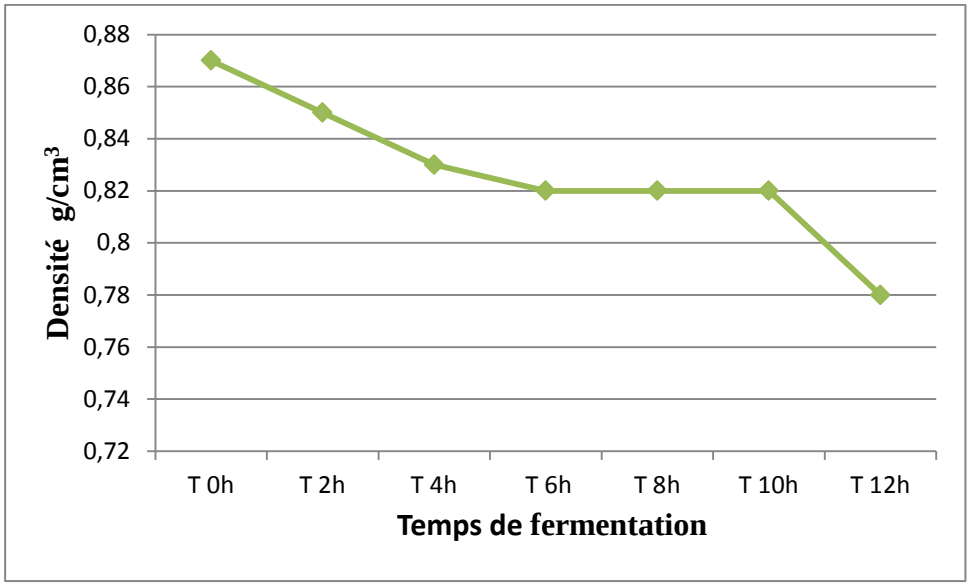


Figure 06 : Evolution de la densité durant la fermentation.

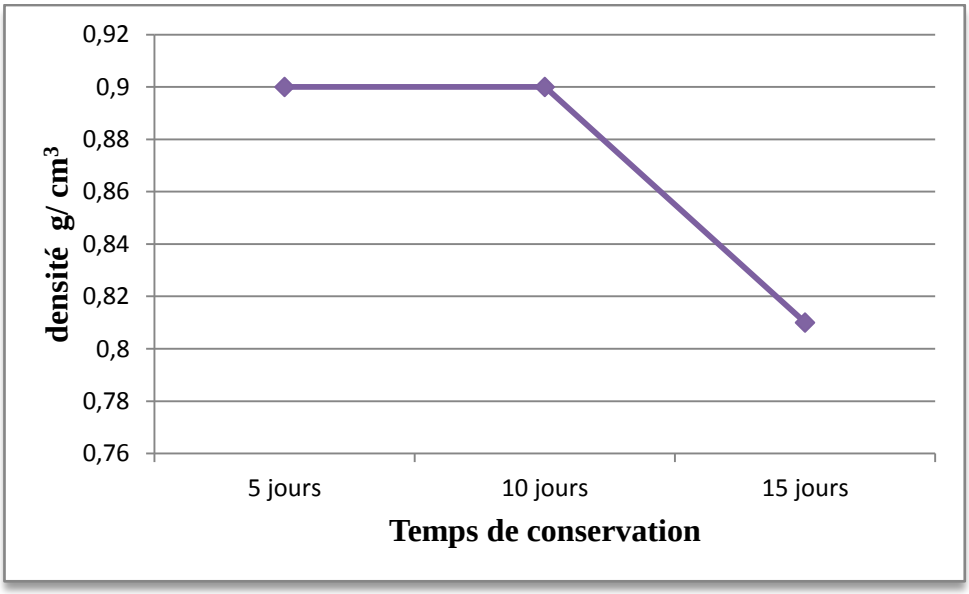


Figure 07 : Evolution de la densité au cours de conservation.

Nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés avec l'étude menée par **Mousavizadeh** *et al.* **(2010),** ayant travaillés sur le même produit, ces auteurs ont trouvé une densité en fin de fermentation qui oscille entre 0.94 à 0.98 g/cm^3. Cette comparaison, laisse constater que le potentiel technologique de notre souche est tout à fait différent de celui des souches utilisées par ces auteurs. De même, la diminution de la densité est un signe de dégradation des nutriments complexes que contient le jus de concombre tel que les pectines, les tannins et autres.

III.1.4. Evolution du nombre de cellules viables: Au cours de la fermentation de jus de concombre, le nombre de cellules viable est suivi et calculé en utilisant la cellule de Malassez. D'après les résultats de la **figure 08**, il apparait que le nombre de cellules viables de *L.plantarum* augmente durant la période de la fermentation pour atteindre en fin de fermentation $19.9x10^{14}$ cellules/ml. L'analyse de la courbe montre un phénomène de diauxi, pour lequel, entre 6 et 8h de fermentation, il y à eu une phase presque stationnaire, mais au-delà, il y à eu une reprise de la croissance et la duplication de la souche.

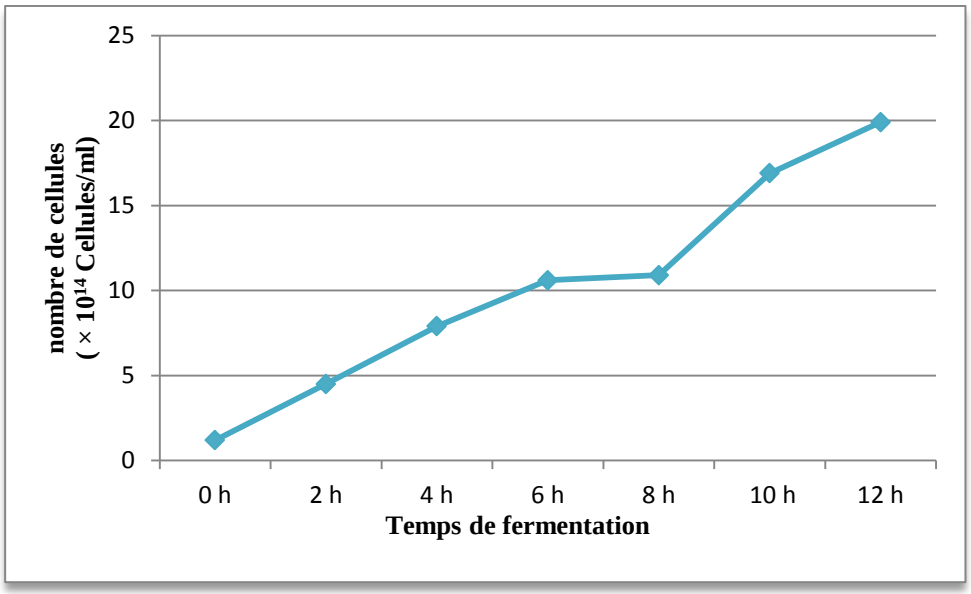


Figure 08 : Evolution du nombre de cellules au cours de la fermentation.

Au cours du stockage, le nombre de cellules viables diminue progressivement après 5jours, 10 jours et 15 jours de conservation où les nombres trouvés sont dans l'intervalle de 12.1 - $13.9x10^{14}$ cellules/ ml de jus. Ces résultats sont attendus, du moment que l'effet du froid sur la viabilité des microorganismes est déjà connu.

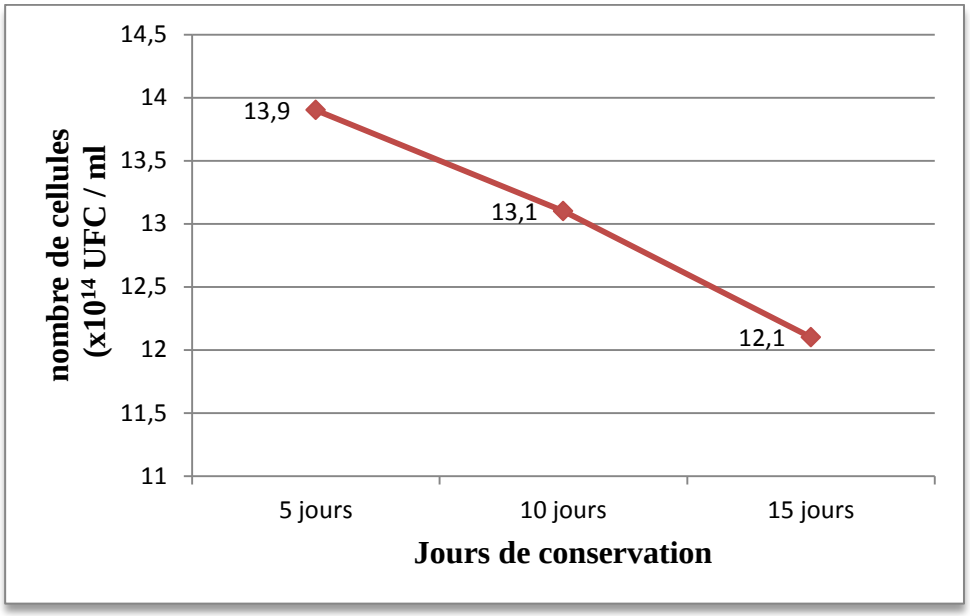


Figure 09 : Evolution du nombre de cellules après la conservation.

Nos résultats sont presque comparables à ceux trouvés par **Lavinia** *et al.* **(2012)** qui ont mené une étude sur la fermentation du *L.acidophilus* dans le jus de concombre a montré que le nombre de cellules viables du jus de concombre par *L.acidophilus*. Leurs résultats ont montré une augmentation du nombre de cellules durant la fermentation pour atteindre $18.6x10^{14}$ UFC/ml après seulement 8 heures de fermentation.

De même, les résultats de l'étude menée par **Franco et Pérez-Diaz (2012)** ont montré que le nombre de cellules viables de *L. plantarum* dans le jus de concombre lacto-fermenté augmente, dont le nombre maximal atteint $6.9x10^{10}$UFC/ml après une semaine de fermentation.

III.1.5.Evolution de la teneur en vitamine C : L'acide ascorbique où bien ce qui est connu comme vitamine C, est un élément essentiel dans la composition de fruits et légumes. Les résultats du dosage de la vitamine C dans le jus de concombre lacto-fermenté et même après la conservation sont illustrés par la **figure 10.**

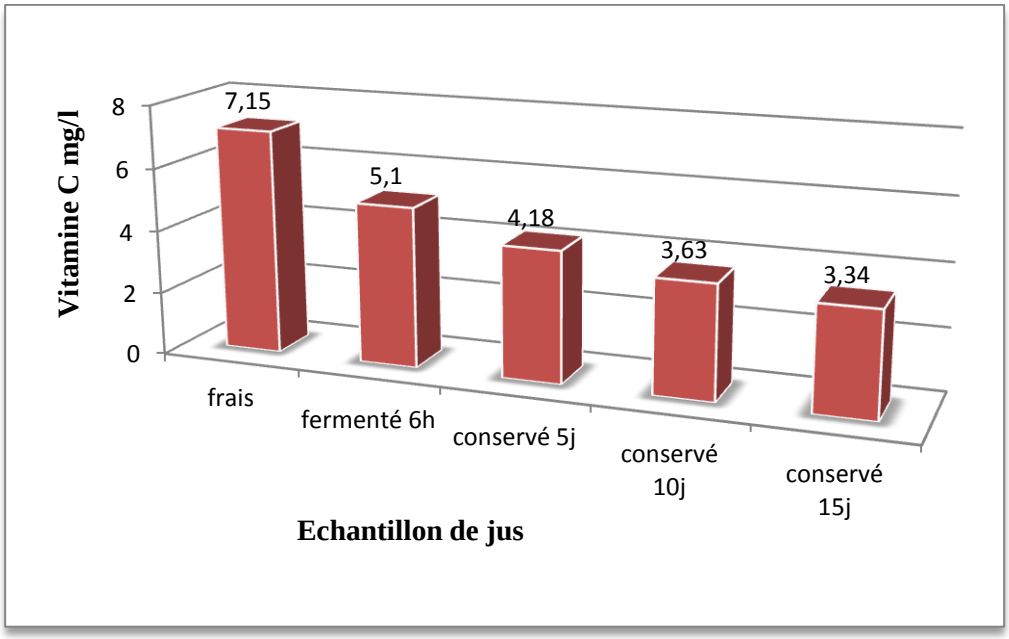


Figure 10 : Evolution de la teneur en acide ascorbique du jus de concombre fermenté.

Les résultats montrent une teneur élevée en acide ascorbique pour le jus brut de l'ordre de 7.15 mg/l, après 6 heures de fermentation cette teneur s'est trouvée réduite à 5.1 mg/l, la diminution de la teneur en vitamine C continue après la conservation de jus pour atteindre 3.34 mg/l après 15 jours de conservation. Cette évolution de la teneur en cette vitamine est attendue, car, elle est instable et c'est elle qui contribue à la stabilité du jus contre les phénomènes oxydatifs induits par d'autres facteurs intrinsèque et extrinsèques au produit.

En utilisant des souches de même genre **Tyagi** *et al.* **(2016)** ont mené des études sur le même produit, et ils ont constaté, également une réduction de la teneur en acide ascorbique au cours du stockage, les teneurs en cette vitamine C trouvés par ces auteurs entre la période de fermentation et la fin de conservation étaient entre 11mg/100ml et 3.5mg/100ml.

III.1.6.Teneur en matière sèche et en cendres: La **figure 11** regroupe les résultats de l'évolution de la teneur en matière sèche de jus de concombre brut, produit fini ainsi que celles de jus conservé 5jours, 10 jours et 15 jours, où on remarque que la teneur en matière sèche de ce produit fermenté diminue au cours de la phase de conservation au froid. Au départ, le jus brut est à 5.2% de matière sèche, après fermentation et conservation, il y à une diminution pour atteindre en fin de conservation une teneur estimée de 2.6%. Cette évolution dégradante de ce paramètre est probablement liée à l'effet du froid ou encore à la bioconversion de quelques nutriments en produits volatils aromatisants.

Une étude similaire réalisée par **Lu** *et al.* **(2002)** sur la même matière première a montré des résultats similaires aux nôtres, avec une teneur en matière sèche variant entre 4.34 et 5.01% selon l'échantillon de concombre.

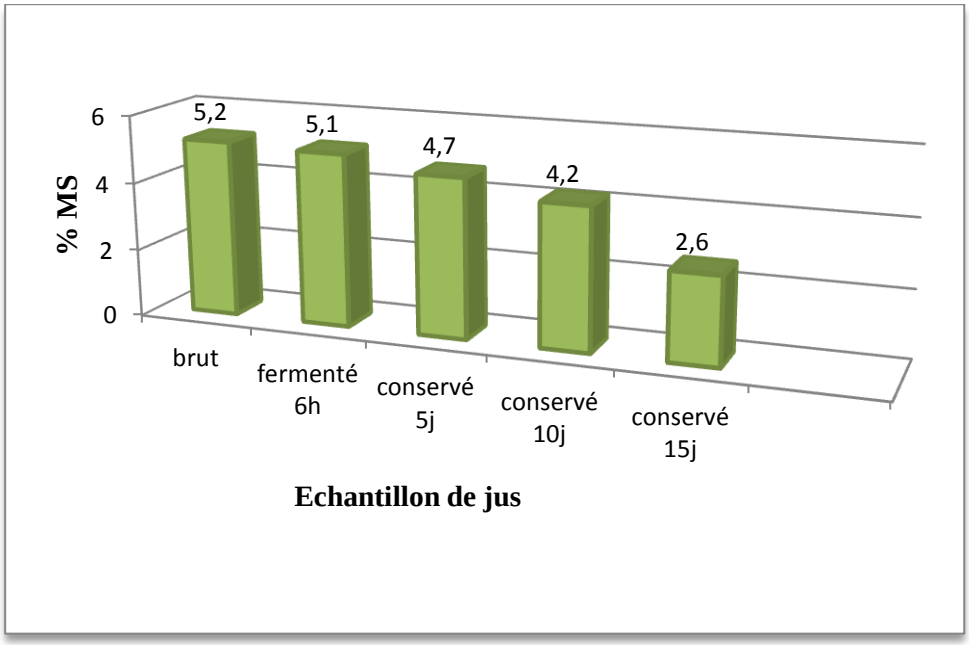


Figure 11: Evolution de la teneur en matière sèche du jus de concombre fermenté.

Par ailleurs, la **figure 12** regroupant les résultats obtenus pour la teneur en cendres de jus pur, produit fini et également le jus conservé 5jours, 10 jours et 15 jours à 4°C, montre que la teneur en cendres diminue après fermentation de 2.5% pour le jus brut à 1.9% pour le produit fini, de même, après conservation il y à eu encore une diminution de la teneur en ce paramètre qui atteint 1.1% après 15 jours de conservation. Ces résultats sont logiques du moment qu'on a une perte en matière sèche au cours du procès de fabrication et la période de conservation.

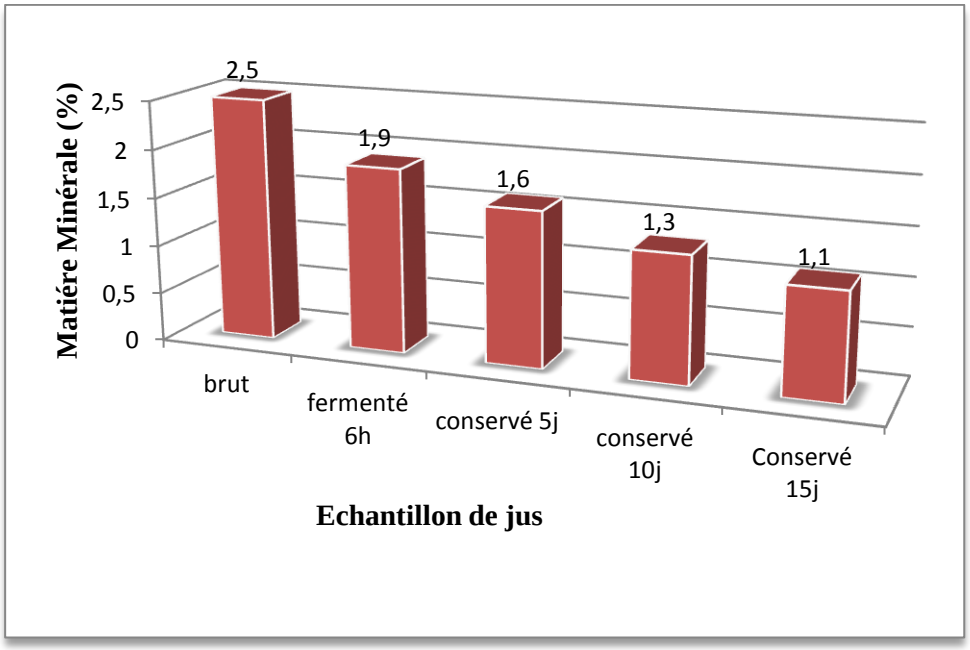


Figure 12 : Evolution de la teneur en cendres du jus de concombre fermenté.

III.1.7. Evolution de la teneur en sucres totaux: La teneur en sucre est calculée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de glucose. Les résultats de la teneur en sucres totaux dans les échantillons de jus de concombre frais, fermenté et celui conservé 5,10 µg/ml et 15 jours sont illustrés par la **figure 13**.

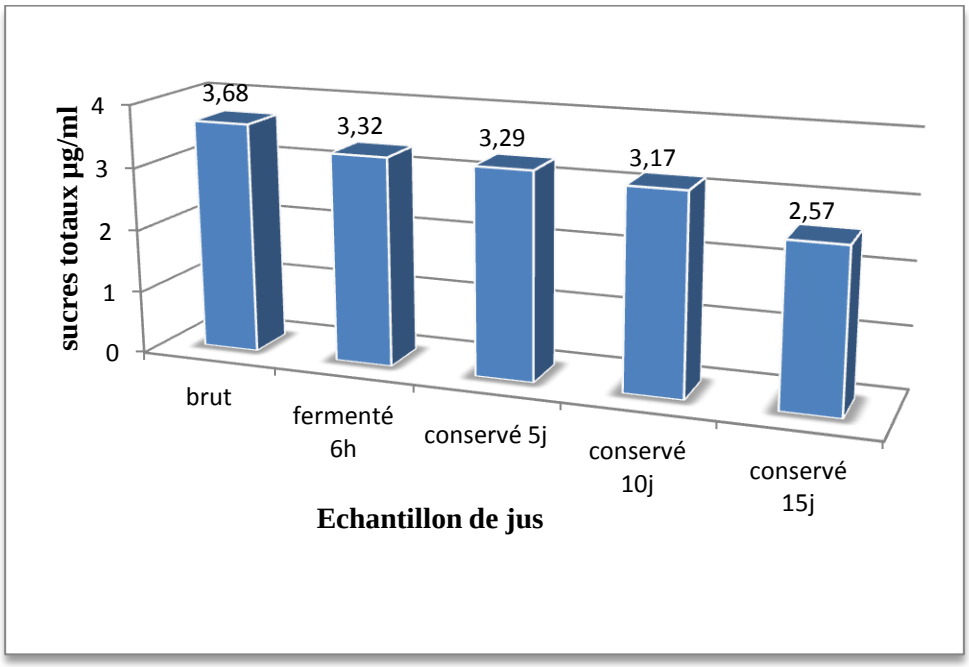


Figure 13: Evolution de la teneur en sucres totaux du jus de concombre fermenté.

D'après les résultats illustrés par cette figure, la teneur en sucres totaux diminue en fonction du temps du stockage, elle était maximale dans le jus brut, estimée à 3.68 µg/ml. Après fermentation, il y à une perte en sucres qui à aboutit à une teneur de 3.32 µg/ml, la diminution continue après la conservation pour aboutir en fin de conservation à une teneur de 2.57 µg/ml. Cette perte en sucres totaux est due probablement à l'utilisation de ces substrats glucidiques par *L.plantarum* comme source de carbone pour la croissance et la production des métabolites notamment l'acide lactique. Cela dit, **Buruleanu** *et al.* **(20l2)** ont justifié la réduction du taux de glucide dans le jus de concombre fermenté par *L.acidophilus* par son utilisation pour la fermentation homo-lactique qui a conduit à l'acidification de milieu. Par ailleurs, l'étude menée par **Kuar** *et al.* **(20l**6**)** a montré que *L.acdophilus* et *L.plantarum* utilisent le sucre de jus de tomate pour leur propre métabolisme fermentaire, c'est-à-dire pour la production d'acide lactique.

Cependant les résultats de l'étude réalisée par **Lu** *et al.* **(2002)** sur le même produit sont comparables aux nôtres, ces auteurs ont montré que la teneur en sucres totaux de jus de concombre fermenté varie de 1.75 à 2.45 µg/ml.

III.1.8.Evolution du degré Brix: Le degré Brix représente les solides solubles dans l'eau. Dans nos échantillons, il est remarquable que le degré Brix du jus frais, jus lacto-fermenté conservé à 4° pendant 10j et 15j est presque le même, il varis entre 3.2 et 3.5°B. Cependant, ce paramètre a connu une diminution après les 6h de fermentation et les premiers cinq jours de conservation.

Le degré Brix trouvé est dans la gamme trouvé par **Liu** *et al.* **(2016)** qui ont montré que le degré Brix de jus de concombre est entre 2.13 et 2.63 °Brix, plus précisément, durant la conservation, ce paramètre était entre 2.10 à 2.13 °Brix. Cependant, une autre étude menée par **Zhao** *et al.* **(2013),** a montré que 3°Brix est le taux de totales solubles de jus de concombre trouvé durant le stockage.

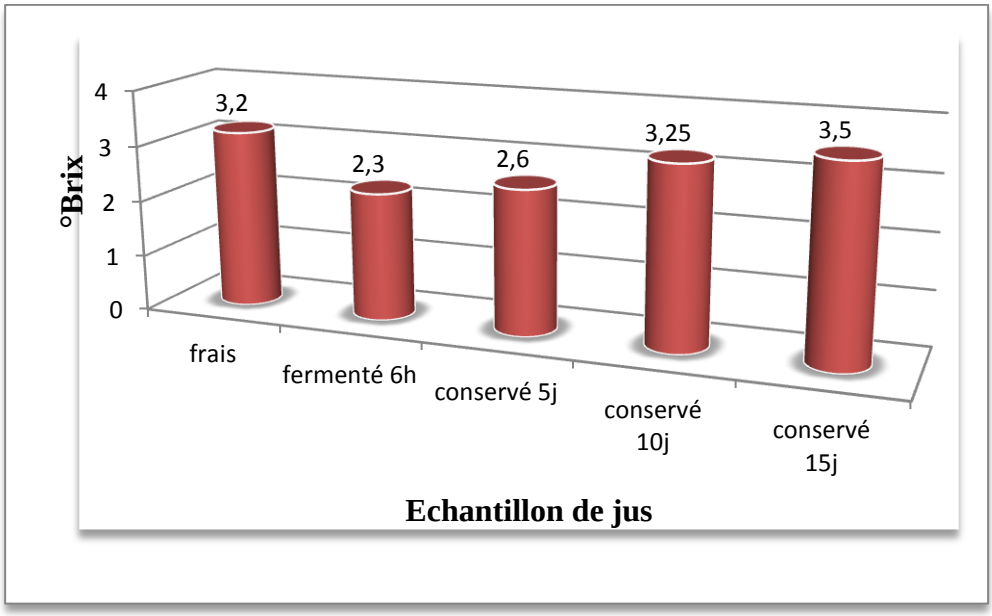


Figure 14 : Evolution du degré Brix du jus de concombre fermenté.

III.1.9.Evolution de la teneur en azote totale et en protéines: D'après **Rahman** *et al.* **(2015)**, le concombre brut contient 0.812g de protéines /100g du produit. La **figure 15** représente le taux de protéines brutes ainsi que l'azote total dans les échantillons de jus de concombre brut, fermenté et conservé 5,10 et 15 jours.

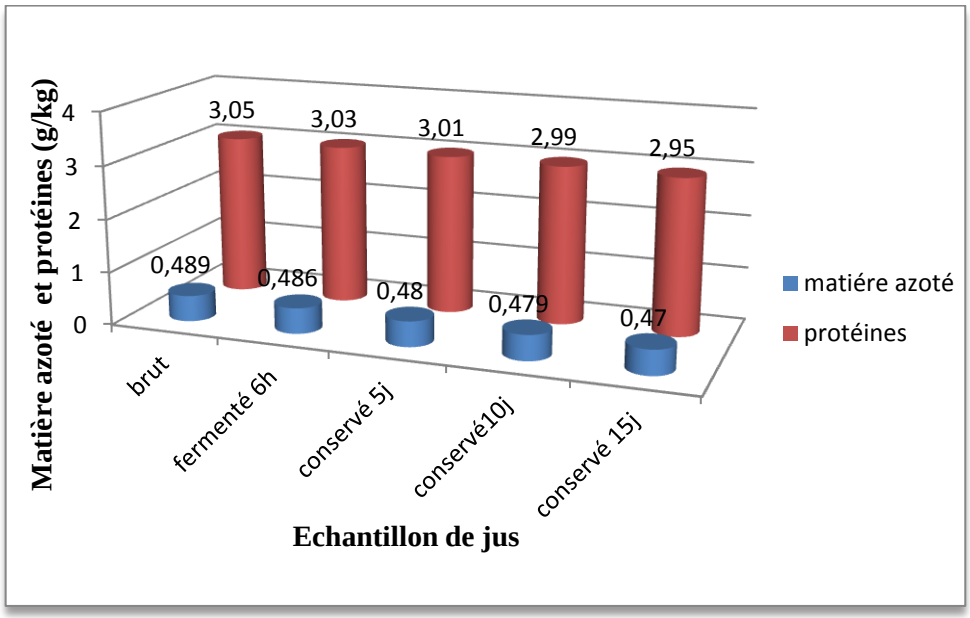


Figure 15: Evolution des teneurs en azote total et en protéines du jus de concombre fermenté.

Les résultats de la **figure 15** montre que les taux en matière azoté et en protéines brutes sont compatibles, le taux de protéines se situe entre 2.95 et 3.05g/kg, où la teneur maximale est

enregistrée avec le jus brut (3.05g/kg), cette dernière a resté presque à même valeur après fermentation (3.03g/kg), de très faibles pertes en cet élément ont été enregistrés au cours de la conservation. Ces résultats peuvent être justifiés par l'étude de **Kumar** *et al.* **(2015),** qui ont trouvé que la cuisson de jus de légumes a un effet direct sur les nutriments dont elle contribue à la perte de protéine par la détérioration de leur structure enzymatique. La faible perte peut être justifiée également par l'effet du froid due à la conservation à 4°C.

III.1.10. Evolution de la teneur en polyphénols totaux: Les résultats de la teneur en polyphénols totaux sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en mg équivalent d'acide gallique/100ml de jus fermenté.

D'après les résultats de la figure ci-dessous, le jus de concombre frais possède la teneur la plus élevé en polyphénols totaux, de l'ordre 450mg EAG/100ml, la teneur diminue après la fermentation pour aboutir à une quantité de 315mg EAG/100ml. Cependant, la perte est trop prononcée au cours de la conservation, ainsi après 15jours de conservation à 4°C, une quantité de 139.3mg EAG/100ml de jus fermenté a été déterminée. Cette dernière montre clairement qu'il y à une forte perte en ces composés intéressants pour la santé humaine.

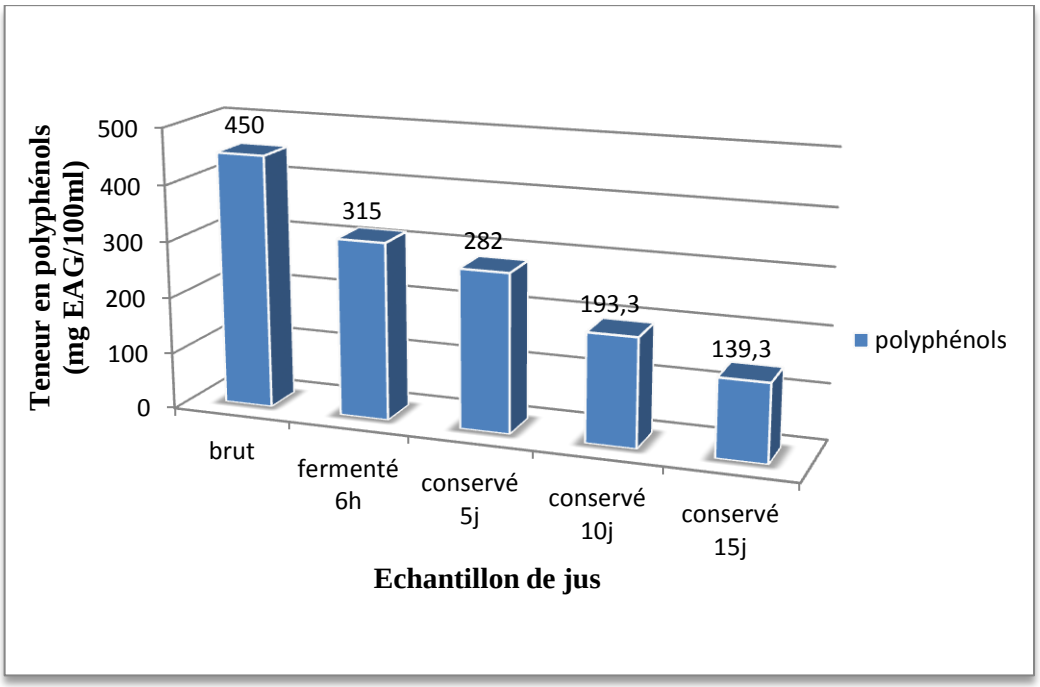


Figure 16 : Evolution des teneurs en polyphénols du jus de concombre fermenté.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par **Lopez** *et al.* **(2016).** Ces auteurs ont essayé d'expliquer la perte en polyphénols lors de la fermentation et de la conservation par un effet

associant, la présence de la bactérie lactique et la réaction entre les polyphénols oxydés et les nouveaux composants oxydatifs qui caractérise le traitement thermique, ils ont justifié la perte également par l'effet du stockage.

III.1.11. Evolution de la teneur en éléments minéraux: Les résultats de la teneur en potassium et en sodium sont illustrés par la **figure 17**.

D'après les résultats de la **figure 17**, on remarque que la teneur en potassium de jus de concombre fermenté est variable, elle est de l'ordre 12.65 mg/ 100ml du produit brut, elle augmente dans le produit fini après fermentation à 13.6 mg/ 100 ml du produit, cependant au cours de la conservation nous constatons que la première analyse faite après 5 jours de stockage a donné une teneur 10.6 mg/100ml, donc une perte en cet élément après les 6h de fermentation, en revanche, nous assistons à une ré-augmentation de ce composé dans le jus fermenté après 10 et 15 jours de conservation (13.7 mg/100ml de jus fermenté).

Concernant, la teneur des échantillons de jus en sodium, il suit presque les mêmes qu'à connu l'élément calcium, il est variable d'une période à une autre. Dans le jus brut, la teneur était de 54.38 mg/100ml, cette dernière a augmente après fermentation à 58.34 mg/100ml. Au cours de la conservation, nous trouvons une diminution après 5 jours de conservation à 41.24 mg, suivie d'une ré- augmentation à 62.36 mg après 10 jours, pour qu'enfin, elle chute à 54.81 mg après 15 jours de conservation.

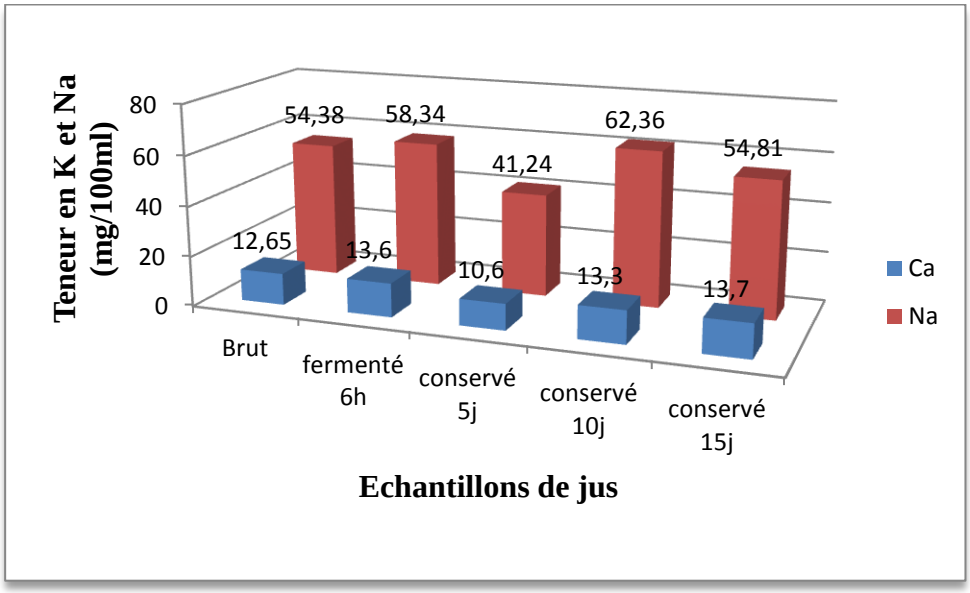


Figure 17 : Evolution de la teneur en calcium et en Sodium du jus de concombre fermenté.

III.1.12.Teneur en métaux lourds : La teneur en métaux lourds est déterminée par spectroscopie d'absorption atomique. Les résultats sont illustrés dans la **figure 18.** Nous constatons que la teneur en cuivre de jus de concombre est trop faible par rapport à celle du Zinc pour l'ensemble des échantillons de jus. Ainsi, pour le cuivre, on remarque que le produit fini contient plus que le produit frais, cette teneur est estimée de 0.00676mg/100ml ; alors que la teneur en **Cu** augmente après fermentation de la matrice alimentaire, cependant, il y à une perte de cet élément après 5 et 10 jours pour se retrouvée à 0.00366 mg/100ml.

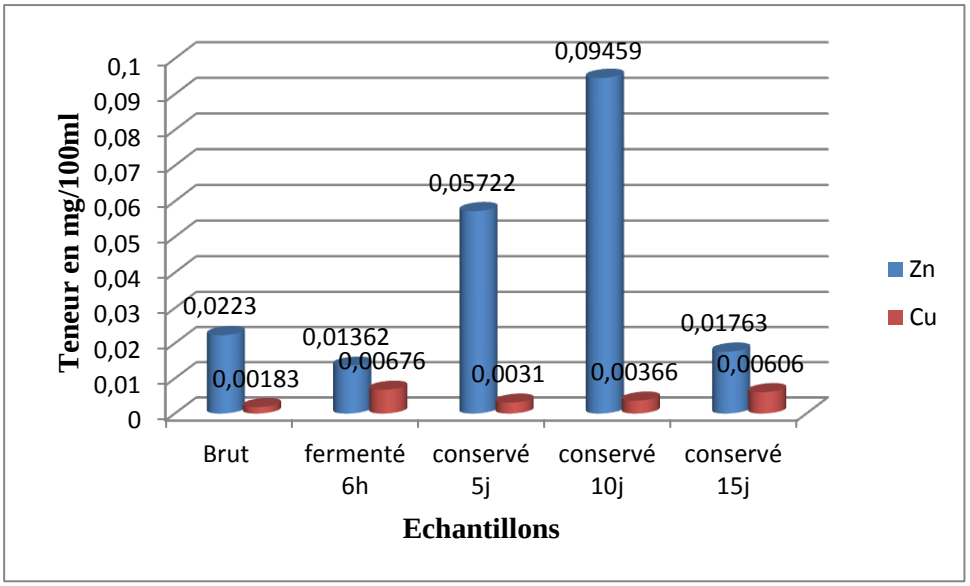


Figure 18: Teneur en Zn et Cu des échantillons de jus de concombre.

Pour le **Zinc**, la fermentation affecte la teneur en Zn, où la teneur en cet élément a diminué dans le produit fini comparativement au jus brut qui avait 0.0223mg/100ml, en revanche, la conservation avait un effet sur la stabilité de cet élément dans le produit dont après 15jours de conservation, une teneur de 0.01763mg/100ml du produit a été retrouvée.

III.1.13. Evolution de la teneur en flavonoïdes: Les flavonoïdes sont des composées phénoliques essentielles dans le concombre, de ce fait ils ont été déterminés pour les différents échantillons.

Selon les résultats de la **figure 19**, la teneur en flavonoïdes est en diminution continue. Il est a constaté que le produit brut renferme 411.86 µg/ml, après fermentation, l a teneur reste toujours appréciable de l'ordre de 412.53µg/ml, en revanche, la conservation a affecte ce paramètre, ou on assiste à diminution, c'est-à-dire une perte au cours des trois périodes de conservation pour arriver à 182.64µg/ml de jus fermenté après 15 jours de conservation. **Babajide** *et al.* **(2013)** ont montré la présence des flavonoïdes dans le jus mixte de concombre-ananas.

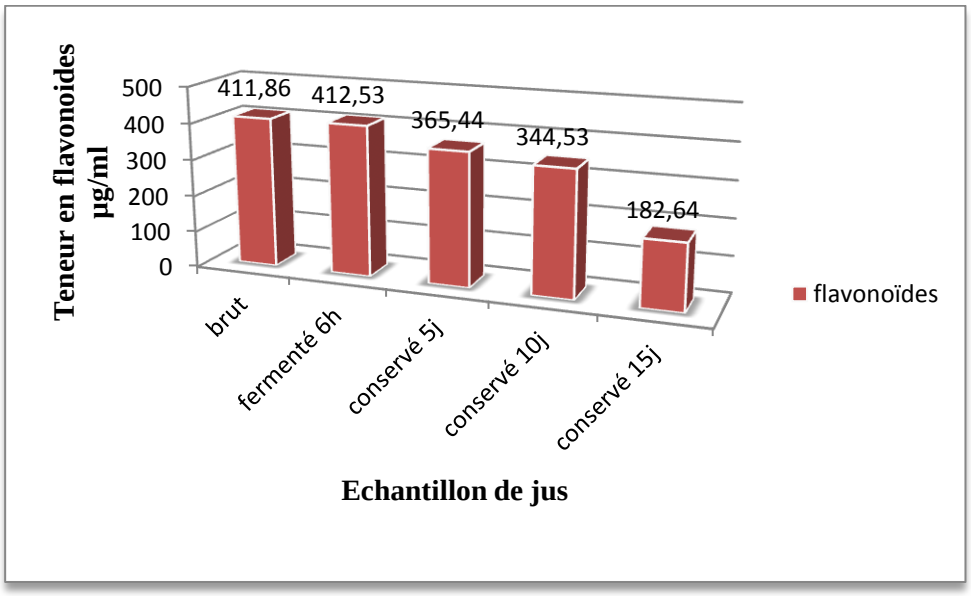


Figure 19 : Evolution de la teneur en flavonoïdes dans le jus de concombre fermenté.

III.1.14.Contrôle microbiologique des jus de concombre : Le dénombrement de la FTAM et la recherche et dénombrement des levures et moisissures dans les jus de légumes est une étape critique car, ces contaminants peuvent affecter la qualité organoleptique du jus **(Idoui, 2013).** Nos résultats montrent une absence totale de la flore totale, qui renseigne sur le degré de pollution du produit, la FTAM, ce qui témoigne le respect des règles d'hygiènes lors de la fabrication du produit, ainsi, les moisissures sont totalement absentes, alors qu'il y à présence de quelques levures dont le nombre varie de 3.10^3 à 13.10^3/ml. Cette contamination est probablement liée à des contaminants de l'environnement du laboratoire, car lors de la réalisation des tests probiotiques, aucun contaminant n'a été détecté sous microscope.

Tableau 02: Résultats du contrôle microbiologique

Echantillon	Jus brut	Jus lacto-fermenté	Jus conservé 5 jours	Jus conservé 10 jours	Jus conservé 15 jours
Flore aérobie mésophile totale (UFC/ml)	00	00	00	00	00
Moisissures (UFC/ml)	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Levures (UFC/ml)	Indénombrable	Indénombrable	13×10^3	4×10^3	3×10^3

III.2.Evaluation de l'effet combiné matrice alimentaire - conservation sur quelques aptitudes probiotiques de *L.plantarum*

Cette partie a été réalisée dans le but d'évaluer l'effet de la matrice alimentaire ainsi que la conservation sur les aptitudes probiotiques de la souche *L.plantarum.* La souche est ré-isolée du jus de concombre fermenté, et conservé sous régime du froid, cette culture a servi pour l'évaluation de quelques aptitudes probiotiques :

III.2.1.L'hydrophobicité : L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre le microorganisme et la cellule hôte. Cette interaction initiale précède le phénomène d'adhésion **(Schillinger** *et al.*, **2005).** Par ailleurs, le test d'adhésion aux solvants est largement utilisé pour déterminer l'hydrophobicité de la surface d'une cellule bactérienne **(Collado** *et al.*, **2008).**

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de *L.plantarum* vis-à-vis du chloroforme, xylène, toluène et éthyle acétate. Les résultats sont illustrés par la **figure 20**.

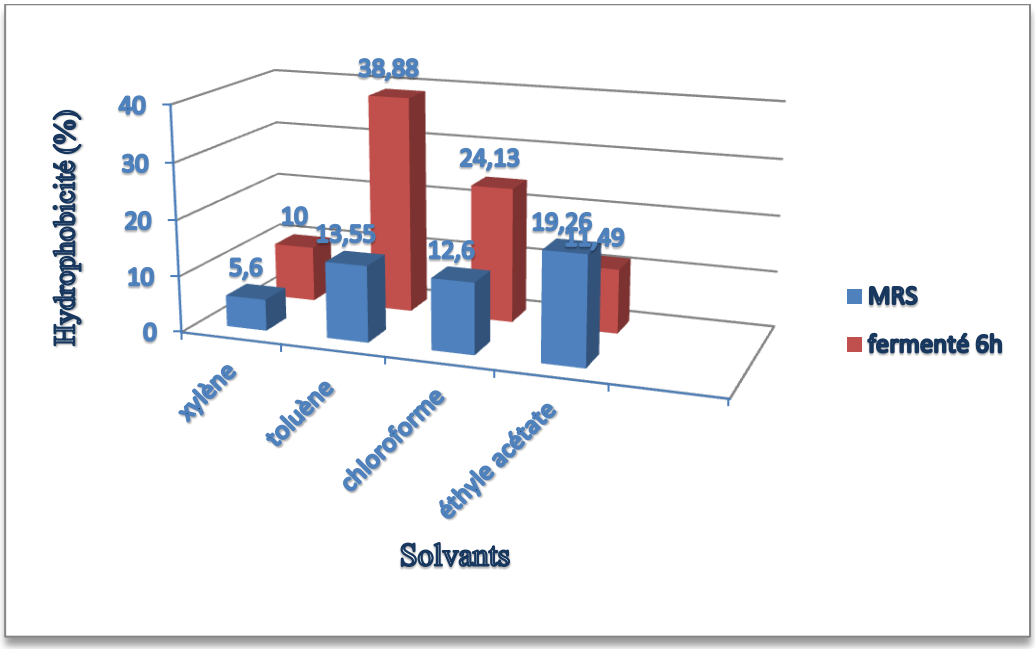


Figure 20 : Pourcentage d'hydrophobicité de *L.plantarum* ré-isolée du produit fini et du bouillon MRS.

D'après ces résultats, on remarque que la culture récupérée du produit fini montre une meilleure hydrophobicité avec le toluène dont le pourcentage était de 38.88%, alors qu'elle est plus faible

avec l'éthyle acétate et le xylène avec respectivement 11.49% et 10%. Cependant, la même souche ré-isolée du bouillon MRS et ré- examinée pour ce test a donné des résultats toute à fait différents. La meilleure hydrophobicité a été obtenue avec l'éthyle acétate (19.25%), suivis du toluène et chloroforme (13.55% et 12.60%), en revanche la plus faible hydrophobicité est obtenue avec le xylène (5.6%).

La comparaison des résultats prouve que le milieu de croissance de la souche affecte cette aptitude probiotique, dans notre cas, le jus de concombre avait un effet positif sur les performances d'adhésion aux composés organiques. Par comparaison aux données rapportées **Ekmelci** *et al.* (**2009),** pour lesquelles, l'hydrophobicité est classée comme faible si le pourcentage est entre 0 et 35%, modérée s'il est de 36 à 70% et forte s'il est entre 71-100%, nous trouvons qu'avec le toluène, notre souche a une hydrophobicité modérée, avec le reste des solvants, elle a une hydrophobicité faible.

Les résultats de l'étude menée par **Savedbowrn** *et al.* **(2014)** sont proches des nôtres, ces auteurs ont trouvé également que *L.plantarum* avait une bonne hydrophobicité avec toluène, elle était comprise entre 47.14 et 99.79%. En revanche, les résultats de l'étude menée par **Collado** *et al.* **(2008)** ont montré que la souche *L.salivarus* avait un pourcentage d'adhésion au xylène de 1.5%.

Dans une autre étude menée par **Handa et Sharma (2016),** *L.plantarum* avait un pourcentage de 50.8% d'hydrophobicité au xylène, 36.10% au toluène, 9% au chloroforme et 20.4% à l'éthyle acétate.

Selon **Collado** *et al.***(2008),** la haut pourcentage d'adhésion au solvant apolaire xylène sert à distinguer une souche hydrophobe de celle hydrophile. Le chloroforme est un solvant acide accepteur d'électrons, l'éthyle acétate est un solvant basique donneur d'électrons et peut reflète le potentiel d'une souche à coloniser le mucus intestinal.

Les données recueillis ont montré que la même espèce isolée de niche écologique différente se comporte différemment aux solvants. **Shekh** *et al.* **(2016)** ont été trouvé des résultats proche des nôtres, ou le pourcentage d'adhésion de *L.plantarum* au chloroforme était de 36 %, en revanche le pourcentage d'adhésion au xylène et toluène était de l'ordre de 21.23 % et 29.09% respectivement.

L'ensemble des résultats obtenus nous laisse conclure que les surfaces de notre souche *L.plantarum* sont hydrophiles et du moment qu'il a été démontré que les souches ayant une hydrophobicité élevée, présentent généralement une adhérence plus élevée aux cellules épithéliales et au mucus

(Savedbowrn *et al.*, **2014)**, nous pouvons dire que notre souche, peut adhérer aux cellules épithéliales non pas par des liaisons électrostatiques mais par des adhésines.

A propos de la même aptitude probiotiques, la culture est ré-isolée du jus de concombre fermenté après 5 jours 10 jours et 15 jours de conservation, et la même aptitude a été évaluée dont les résultats sont illustrés par la **figure 21.**

Il apparait que la souche ré-isolée du jus de concombre après 5 jours de conservation a une capacité d'adhésion plus performante que celle obtenue après son ré-isolement du produit fini. Les résultats montrent que la souche a une affinité à l'éthyle acétate (59.3%). De même, les pourcentages d'hydrophobicité avec le reste des solvants restent importants.

Après 10 jours de conservation, la culture ré-isolée et testée a montré une affinité pour l'éthyle acétate et le chloroforme (40.62% et 39.13%), en revanche, il est à constater qu'il y à une perte d'affinité pour le xylène et le toluène, ce qui nous laisse supposer que notre souche dans de tel conditions, elle peut se servir des caractéristiques de Lewis acide-base de la surface bactérienne pour adhérer aux cellules épithéliales.

Enfin, après 15 jours de conservation à 4°C, la culture ré-isolée a changé encore une fois son affinité et a montré un pourcentage d'hydrophobicité avec le xylène et le toluène.

Ces résultats laissent constater que la souche peut changer de comportement en fonction des conditions physico chimique du milieu et en fonction des paramètres extrinsèques. Cela dit et d'après **Savedbowrn** *et al.* **(2014),** la différence d'hydrophobicité est due à la variation du taux de protéines cellulaires ainsi qu'aux conditions de l'environnement qui peuvent affecter l'expression de ces protéines de surface de la cellule. Cependant, il se peut que le NaCl ajouté au produit ait un rôle dans les résultats obtenus.

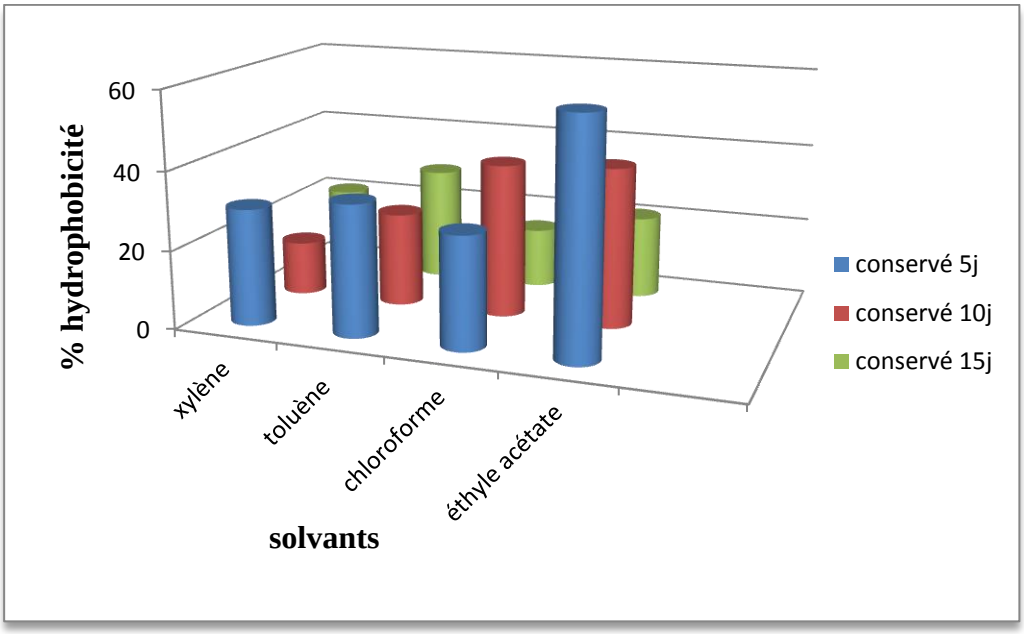


Figure 21 : Pourcentage d'hydrophobicité après 5, 10 et 15 jours de conservation du produit.

III.2.2. L'adhésion : Les difficultés liées à l'étude de l'adhésion des bactéries *in vivo* en particulier chez l'homme ont conduit à développer des modèles plus simples d'adhésion *in vitro* **(Kos** *et al.*, **2003).** L'adhésion des souches probiotiques aux cellules épithéliales et au mucus intestinal est considérée comme propriété probiotique importante, cette adhésion dépend clairement de la composition en protéines de la surface des cellules bactériennes ainsi que celle des cellules hôtes **(Schillinger** *et al.*, **2005; Nakpheng** *et al.*, **2012).**

Avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales et mucus, un test de confirmation est réalisé pour vérifier l'efficacité des lavages et confirmer la pureté de nos cellules. La **photo-microscopique 01** illustre que les tissus sont dépourvues des contaminants.

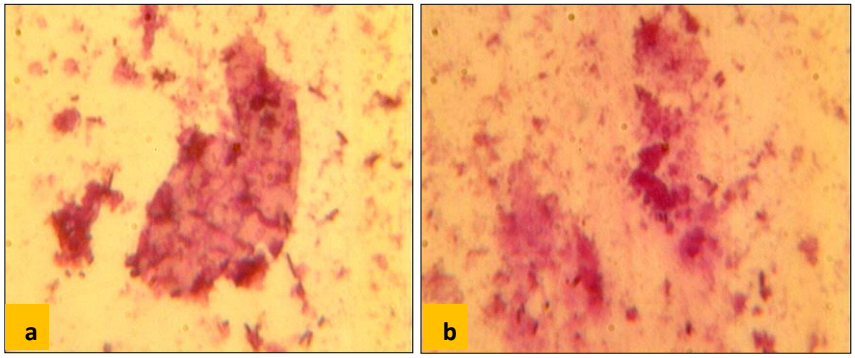


Photo 01: Photomicrographie de : [(a)]cellules épithéliales [(b)] : mucus

L'adhésion a été réalisée en utilisant des cellules épithéliales et mucus d'origine animale (tissus de poulet), sachant que la souche à tester a été récupérée par centrifugation à partir du produit fini qui est le jus de concombre lacto-fermenté. La **figure 22** montre que le nombre de cellule adhéré à aux cellules épithéliales et aux mucus est important dont le nombre dépasse 100 cellules adhérentes. En comparant avec les cellules récupérés du bouillon MRS dans les même conditions, le nombre de cellules adhérentes est le même pour les cellules épithéliales tandis qu'il est plus élevé pour le mucus, ce qui signifie que le jus de concombre n'a pas d'effet négatif sur cette aptitude probiotique.

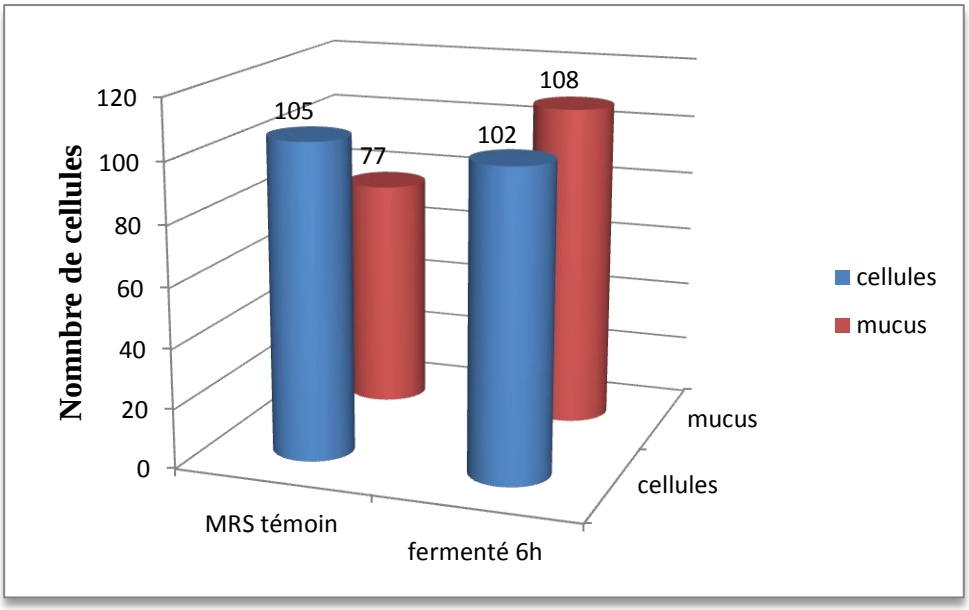


Figure 22: Nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales et au mucus(culture ré-isolée du jus après 6 heures de fermentation)

La photo 02 représente l'observation microscopique où le nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales ainsi qu'au mucus est important.

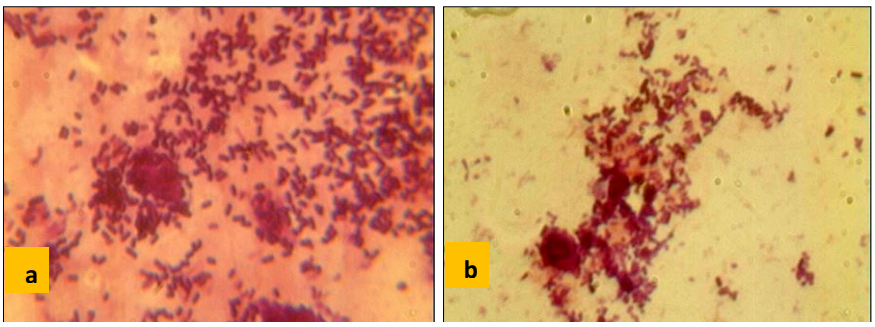


Photo 02 : Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* [(a)] : cellules épithéliales (b) : mucus.

Des travaux ont été réalisés sur cette aptitude probiotique. L'étude menée **Diana** *et al.* **(2015)** a montré que *L.plantarum* présentait un pourcentage d'adhésion au mucus de l'ordre 75.55% après 3 heures d'incubation. Une autre étude menée par **Nakpheng** *et al.* **(2012)** a montré un pourcentage plus élevé d'adhésion de la même espèce, *L.plantarum* aux cellules épithéliales qui pu atteindre 90%. Contrairement à ces résultats, l'étude réalisée par **Nivoliez** *et al.* **(2015)** sur l'adhésion *L.rhamnosus* a montré qu'après 3 heures d'incubation, les pourcentages d'adhésion étaient faibles, ils étaient de 13.44% avec le mucus et 1.32% avec les cellules épithéliales.

Au cours de stockage, les cellules bactériennes à tester sont récupérés du produit fini conservé 5 jours, 10 jours ainsi qu'à 15 jours. Les résultats de l'adhésion après conservation à 4°C sont illustrés par la **figure 23**. Il apparait que le nombre de cellules adhérés aux cellules épithéliales ainsi que celui des cellules adhérées au mucus est affecté par la conservation à 4°C, dont il y à une atténuation de nombre de cellules adhérés tel que les cultures récupérés après une conservation plus longue jusqu'à 20 cellules adhérentes après 15 jours de stockage pour les deux tissus. Donc on constate que la conservation à 4°C affaiblie le pouvoir adhésif de la souche *L.plantarum* aux tissus intestinales.

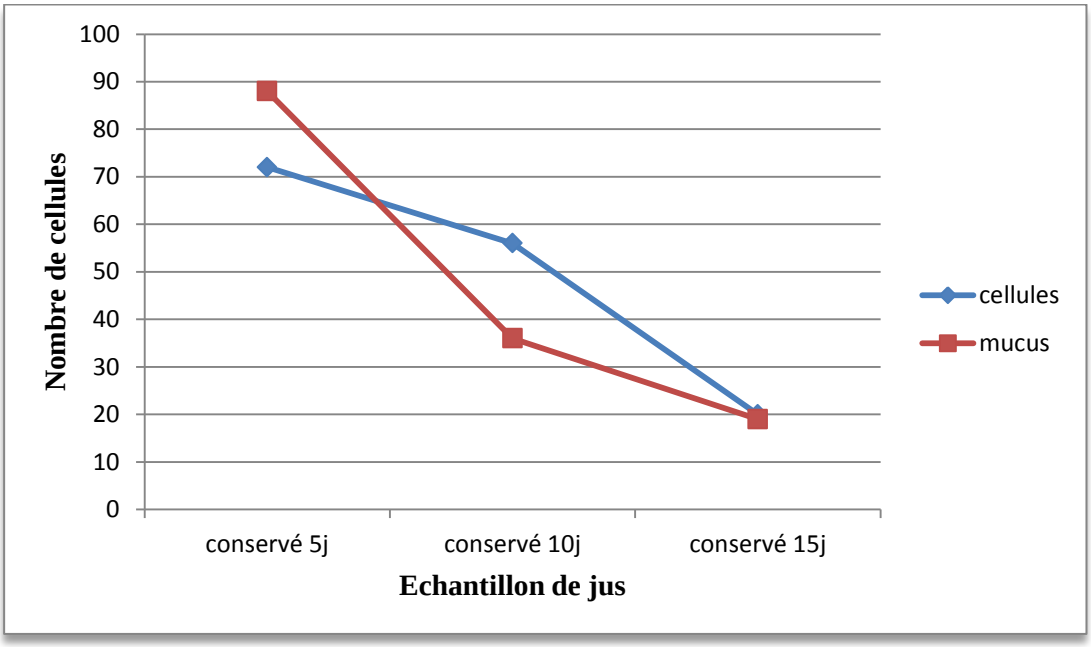


Figure 23 : Evolution du nombre de cellules adhéré aux cellules épithéliales et au mucus au cours du stockage.

Le nombre de cellules adhérentes aux cellules épithéliales et au mucus après 5 jours de conservation sont clairement illustrés par la **photo 03.**

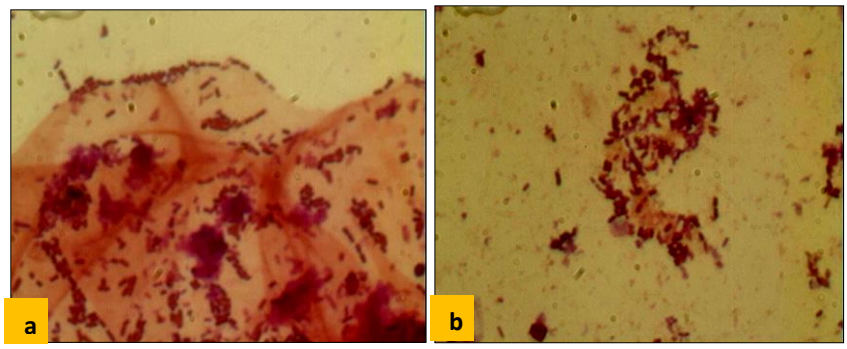


Photo 03: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* [(a)] : cellules épithéliales (b) : mucus

Le nombre de cellules adhérés après 10 jours de conservation est illustré par la **photo 04,** ou il apparait clairement qu'il y à une diminution en nombre de cellules adhérentes.

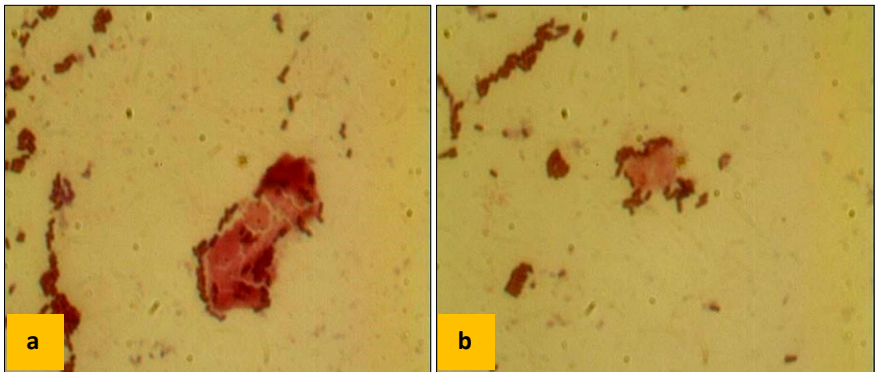


Photo 04: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* [(a)] : cellules épithéliales (b) : mucus

Après 15 jours de conservation, sous l'éffet du froid, cette aptitude se trouve presque perdue et le nombre de cellules adhérantes en témoigne (**photo 05)**.

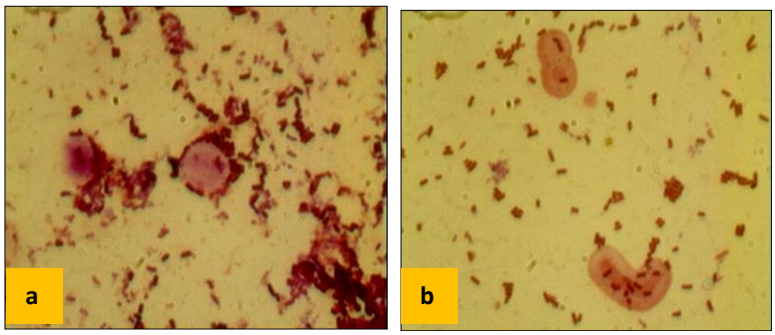


Photo 05: Photomicrographie d'adhésion de *L.plantarum* [(a)] : cellules épithéliales (b) : mucus

III.2.3.Auto/Co-aggregation : La capacité d'auto-agrégation est l'un des mécanismes proposés pour expliquer le rôle protecteur des lactobacilles, c'est un phénomène lié à la formation de biofilm. Cependant, la co-agrégation est l'un des mécanismes d'inhibition des pathogènes **(Tomas** *et al.*, **2005 ; Ilavenul** *et al.*, **2015).**

Le test d'auto-agrégation est réalisé sur la culture récupérée du produit fini ainsi que du produit conservé 5 jours, 10 jours et 15 jours à 4°C. Les résultats de l'auto-agrégation de produit fini sont illustrés par la **figure 24**. Nous remarquons que *L. plantarum* récupérée de jus de concombre fermenté pendant 6 heures possède un faible pourcentage d'auto-agrégation de l'ordre 4.7%. En comparant avec la culture récupérée du bouillon MRS préparé dans les mêmes conditions, l'auto-agrégation est aussi faible 8.33%.

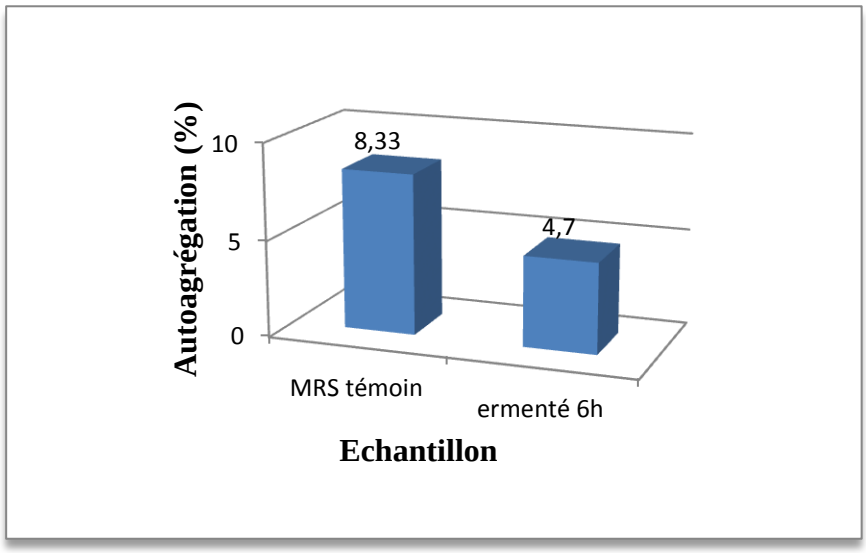


Figure 24: Pourcentage d'auto-agrégation (souche ré-isolée du produit fini).

L'étude menée par **Kaewnopparat** *et al.* **(2013)** a montré que *L.fermentum* possède une faible capacité d'auto-agrégation. Une autre étude de **Collado** *et al.* **(2008)**, a montré contrairement à nos résultats que *L.plantarum* possède un pourcentage d'auto-agrégation de 21.7% après 2 heures de fermentation. Il reste à signaler que les lactobacilles qui ont une bonne capacité d'adhésion aux cellules épithéliales présentent également une bonne capacité d'auto-agrégation **(Polak-Berecka** *et al.*,**2014).**

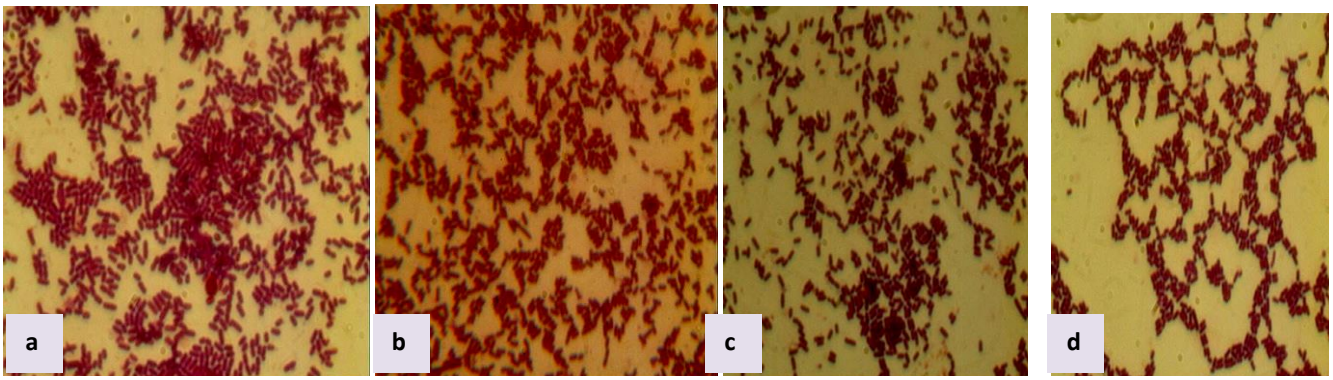


Photo 06: Photomicrographie de l'auto-agrégation de la culture ré-isolée de

(a) : du produit fini, (b) : 5j conservation (c) :10j conservation (d) : 15j conservation

Au cours de la conservation de jus lacto-fermenté, la capacité d'auto-agrégation de la souche *L.plantarum* a diminué progressivement comme l'illustre la **figure 25,** par contre en période de fermentation le pourcentage d'auto-agrégation de la souche est plus élevé (49.27% après 5 jours), puis sous l'effet du froid, il y à une diminution du pourcentage de cette aptitude, dont il est de l'ordre de 18.13% après 10 jours et 12.14% après 15 jours de conservation. Cette diminution est due probablement à l'effet de NaCl qui a probablement affecté les parois des cellules bactériennes, ou bien à la température de stockage et sa durée également.

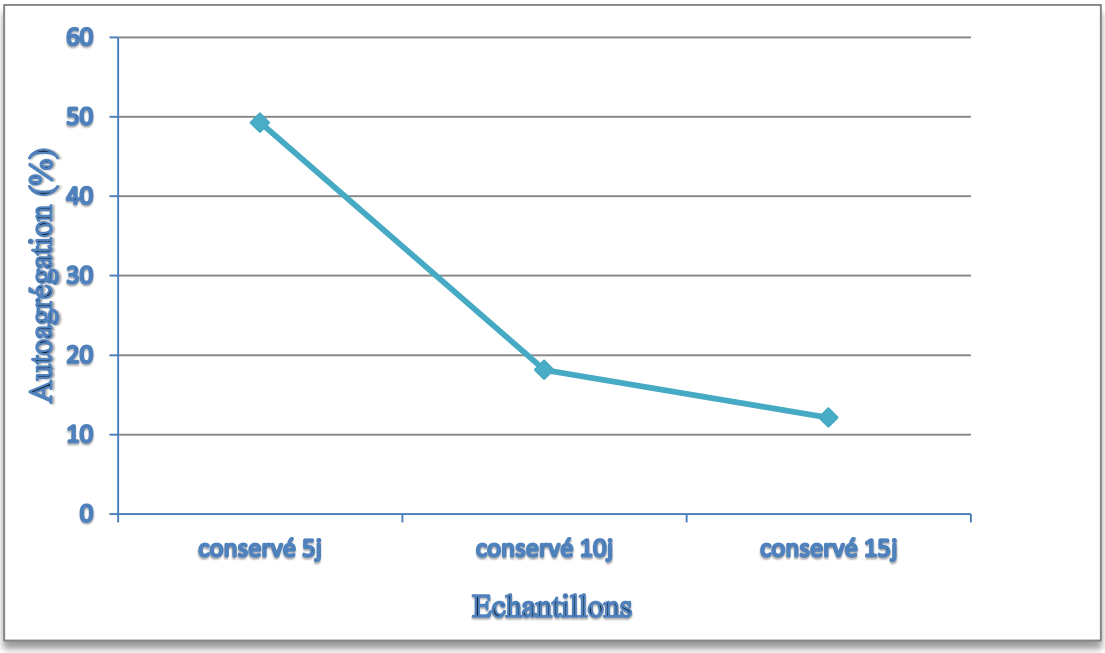


Figure 25: Evolution du pourcentage d'auto-agrégation le la souche ré-isolée du produit conservé.

Pour la co-agrégation : Un test a été réalisé entre la souche *L.plantarum* et les trois souches, *E.coli*, *Staphylococcus* aureus et *Bacillus subtilus*. Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure 26.** D'après les résultats obtenus, on remarque une bonne co-agrégation de *L.plantarum* avec les trois espèces pathogènes *E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilus* où les valeurs sont respectivement de 53.45%, 55.07% et 77.83%. Cependant, on constate qu'il y à une meilleure co-agrégation de *L.plantarum* récupérée du produit fini avec *B.subtilus*. En comparant, ces résultats avec ceux de la souche récupérée du bouillon MRS, on observe que pour les souches *E.coli* et *S.aureus* les valeurs sont les même que celles obtenus avec la souche ré-isolée du jus de concombre fermenté alors qu'avec *B.subtilus*, le pourcentage est plus faible avec un pourcentage de 49.03%. Sur la base de ces résultats, on peut dire que la matrice alimentaire favorise la co-agrégation de *L.plantarum* avec la souche *B.subtilus*.

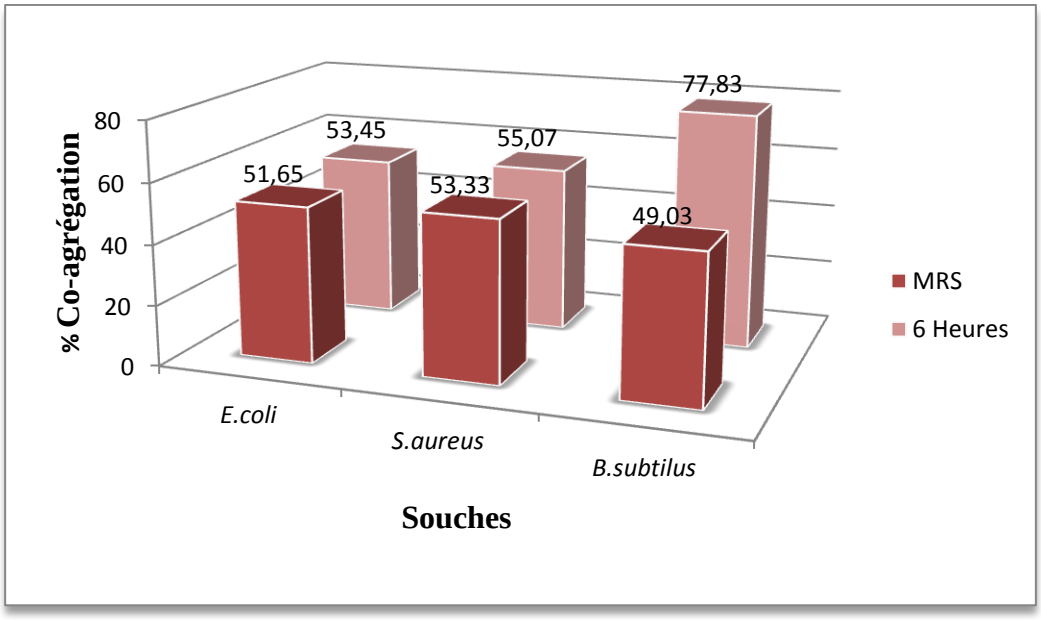


Figure 26 : Pourcentage de co-agrégation de la souche ré-isolée du produit fini

Nos résultats sont aussi meilleurs que ceux trouvés par d'autres auteurs. D'après une étude menée par **Savedbowrn** *et al.* **(2014)**, une souche de *L.acidophilus* parmi plusieurs souches de lactobacilles testées, possède un pourcentage de co-agrégation15.11%. Par ailleurs, **Collado** *et al.(***2008)** ont trouvé que *L.plantarum* a donné un pourcentage de co-agrégation de 22.9 à 24.1% avec *S.aureus* après 4 heures d'incubation, et il a pu atteindre 74% après 24 heures d'incubation. Une autre étude menée par **Dias** *et al.* **(2013)** a montré une co-agrégation modérée de *L.plantarum* avec *E.coli* (17.69%) après 2 heures d'incubation mais elle a pu atteindre 27.71% après 4 heures. En **2015, ILavenil** et ses collaborateurs ont obtenu de bonne résultats de la co-agrégation de

L.plantarum avec *E.coli*. De même **Anandhrayet** *et al*. **(2015)** ont obtenu un pourcentage modéré de 19 à 68% de la co-agrégation des bactéries lactiques avec *E.coli*.

La photo ci-dessous, montre clairement l'aptitude de notre souche à co-agréger les trois espèces mises au test.

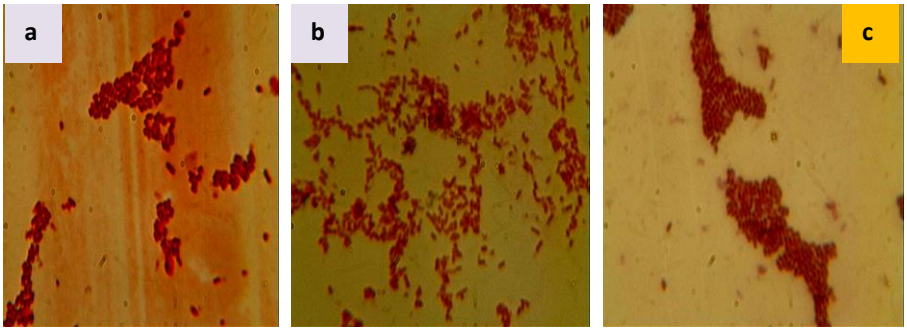


Photo 07: Photomicrographie de la co-agrégation de la culture ré-isolée de produit fini avec

(a) : *E.coli*, (b) : *B.subtilus* (c) :*S.aureus*

Cependant, le ré-isolement de notre souche du produit chaque 5 jours de conservation et sa soumission au même test a donné les résultats représentés par la **figure 27**.

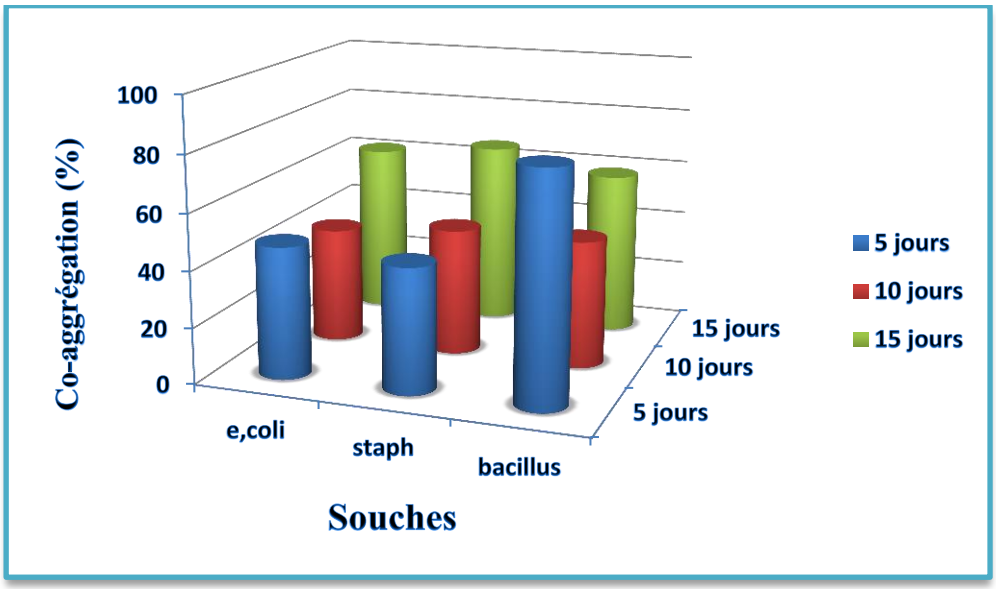


Figure 27 : Pourcentage de Co-agrégation de *L.plantarum* ré-isolée du produit conservé.

D'après ces résultats, le pourcentage de Co-agrégation diffère après la conservation des échantillons d'une période à l'autre et cela laisse ressortir ce qui suit. Pour la culture ré-isolée du produit de 5

jours de conservation, le pourcentage de co-agrégation avec les deux souches *E.coli* et *S.aureus* a diminué par rapport à celui obtenu avec la souche ré-isolée après 6h de fermentation, nous enregistrons des pourcentages respectifs de 47.14% et 48.98%, par contre avec *B.aureus* la co-agrégation était excellente dont le pourcentage était de 81.71%. Cependant, pour la culture ré-isolée du produit de 10 jours de conservation, le pourcentage de co-agrégation à diminué avec les trois souches *E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilus* mais il reste appréciable, il oscille antre 41.44% et 45.7 %. Enfin pour la culture ré-isolée du produit de 15 jours de conservation, le pourcentage de co-agrégation augmente pour tous les souches pour atteindre son maximum avec les souches *E.coli* et *S.aureus* avec 61.86 et 66.08% respectivement.

D'après les résultats, il apparait qu'il y à une diminution de co-agrégation au cours de conservation jusqu'à 10 jours, puis aux quinzièmes jours, on constate à une reprise de cette aptitude par la souche à l'encontre des trois espèces testées. Cette augmentation peut être appuyée par l'intervention des composants pariétaux bactériens, suite probablement à une lyse de cellules.

Ces dessus les photos microscopiques montrant la co-agrégation de *L.plantarum* avec les trois souches pathogènes.

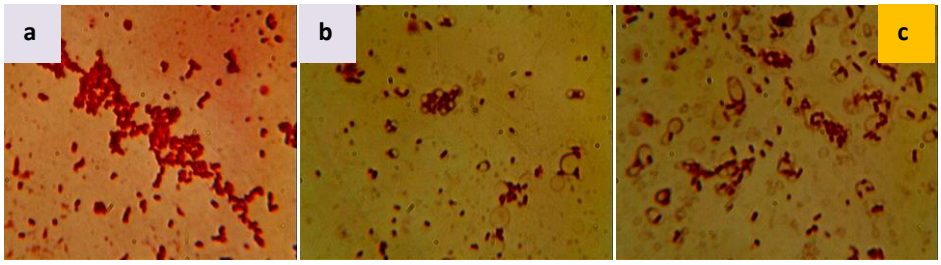


Photo 08: Photomicrographie de la co-agrégation avec *E.coli*
(a) : 5J, (b) : 10J (c) : 15J

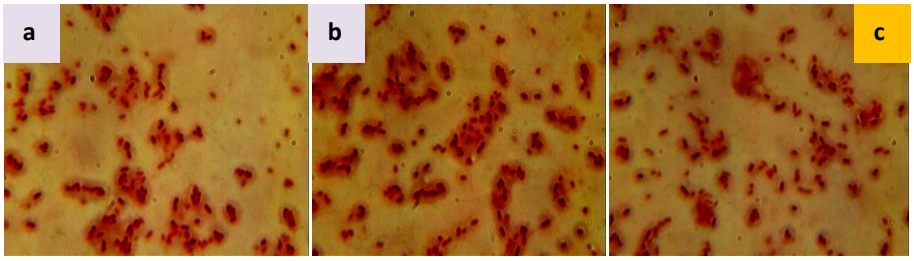


Photo 09: Photomicrographie de la co-agrégation avec *S.aureus*
a) : 5J, (b) : 10J (c) : 15J

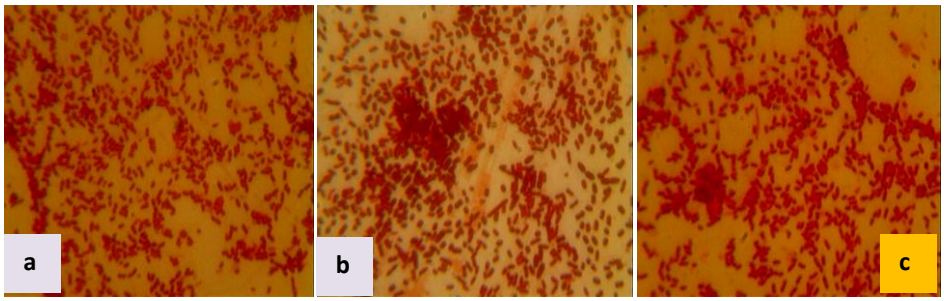


Photo 10: Photomicrographie de la co-agrégation avec *B.subtilis*
a) : 5J, (b) : 10J (c) : 15J

III.2.4.La résistance aux sels biliaires : La résistance aux sels biliaires est l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site, elle est considérée comme condition indispensable à la colonisation et l'activité métabolique des bactéries dans l'intestin grêle, aussi considérée comme facteur essentiel pour déterminer l'efficacité d'un microorganisme comme souche probiotique **(Handa et Sharma, 2016).**

Les résultats de la tolérance de *L.plantarum* ré-isolée du produit sont illustrés par la **figure 28**. D'après la figure, il est clair que *L.plantarum* tolère bien les sels biliaires dont le pourcentage de survie est de 82.11%, il est plus élevé que celui du témoin qui est de 52.29%.

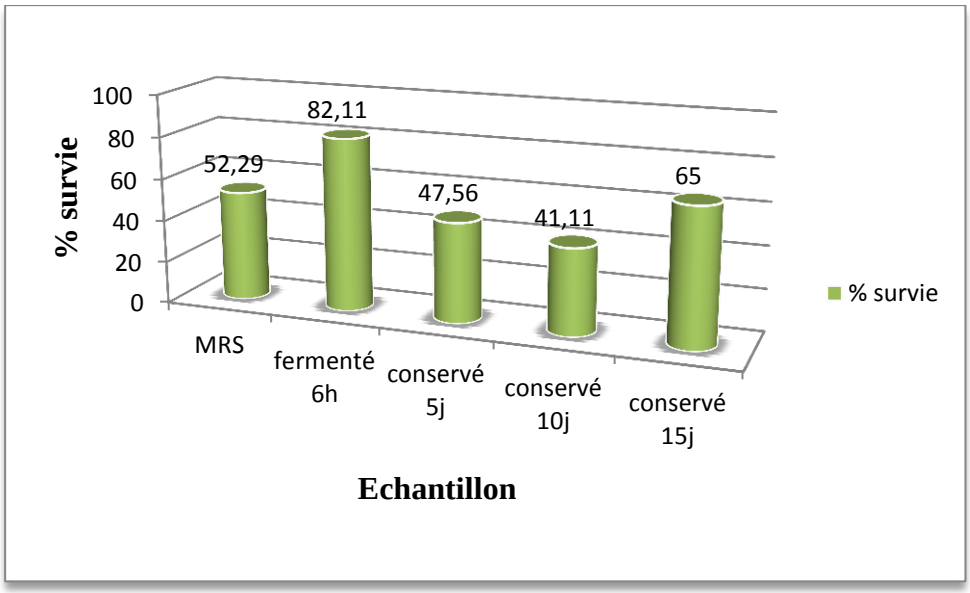


Figure 28 : Pourcentage de survie de *L.plantarum* ré-isolée du produit en présence à 0.3% de sels biliaires.

Une étude menée par **Handa et Sharma (2016)**, a montré qu'une souche de même genre, *L.delbruckii* a donné un taux de survie de 33 à 36% en présence de sels biliaires. Par ailleurs **Park et Lim (2015),** ont obtenu de bons résultats de survie en présence de 0.3% de sels biliaires avec *L.plantarum*, le pourcentage est variable de 96 à 97.4%. Dans une autre étude menée par **Anandharaj** *et al.* **(2015)**, différentes souches de *Lactobacillus* ont toléré 0.3% de sels biliaires et qui s'est exprimé par des pourcentages de 37.26 à 89.34%.

La souche a été également ré-isolée du produit soumis à un régime du froid et les résultats du test ont montré que la résistance de *L.plantarum* à ce facteur hostile persiste mais avec des pourcentages un peu faible mais qui dépasse les 40%. La souche ré-isolée du produit après 5 jours de conservation avait un pourcentage de survie 47.56%, celle ré-isolée du produit après 10jours avait le plus faible taux de survie 41.11%, en revanche, un taux de survie de 65% a été obtenu avec la culture ré-isolée du produit conservé 15 jours à 4°C.

Le nombre de cellules viables est également calculé en utilisant la cellule de Malassez pour la confirmation des résultats de la survie. On remarque d'après les résultats de la **figure 29** que les chiffres se concordent et ceux du taux de survie de la culture en présence de 0.3% de sels biliaires.

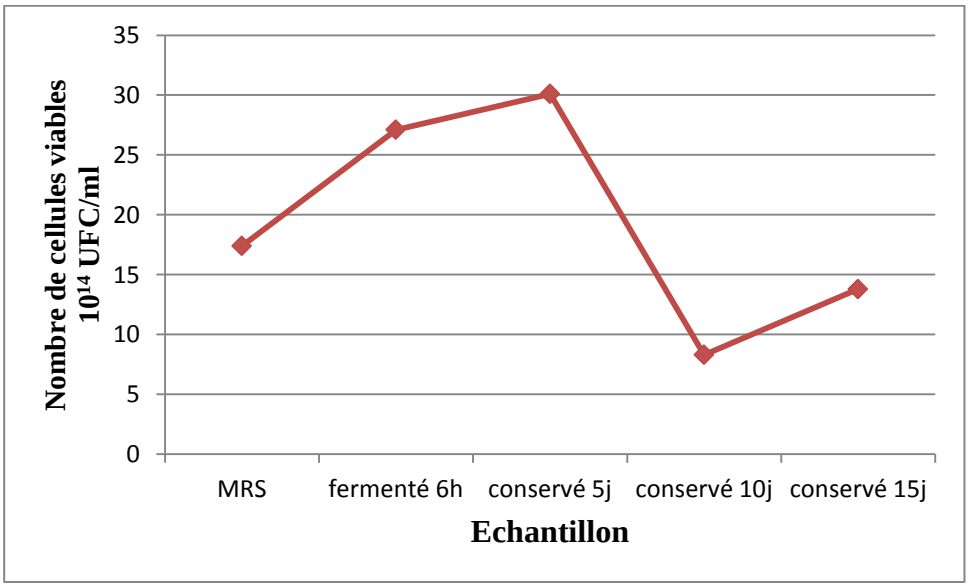


Figure 29 : Nombre de cellules viables en présence de 0.3% sels biliaires.

III.2.5.Tolérance aux pH gastrique : La survie des bactéries à des bas pH est l'indicateur déterminant la capacité des souches à survivrent dans les conditions d'estomac **(Zielnska** *et al.*, **2015).** Les résultats de la survie *in vitro* dans trois milieux aux pH 4, pH3 et pH2 sont illustrés par la **figure 30**. D'après la figure, on remarque que la matrice alimentaire n'affecte pas la survie de la souche à différents pH (pourcentage de survie 95.65%), où le pourcentage de survie le plus élevé est celui de la culture récupérée du produit fini.

Nos résultats sont très proches de ceux trouvés par **Handa et Sharma (2016)**, qui ont obtenu des pourcentages de survie de 97.2% à pH2 et 99.4% à pH3 avec *L.plantarum*. Dans une autre étude menée par **Anandharaj** *et al.* **(2015),** les différentes souches de genre *Lactobacillus* ont montré des taux de survie de 34.41 à 45.22% à pH 2 et à pH, la survie oscille entre 372.33 et 90.16%. De même, l'étude menée par **Bouriden** *et al.* **(2016),** montre que les *Lactobacillus* vaginales présentent une bonne survie à pH 2 après deux heures d'incubation (44.76 à 82.23%).

La tolérance au pH gastrique est évaluée également au cours de la conservation, le taux de survie est illustré par la même **figure 30.**

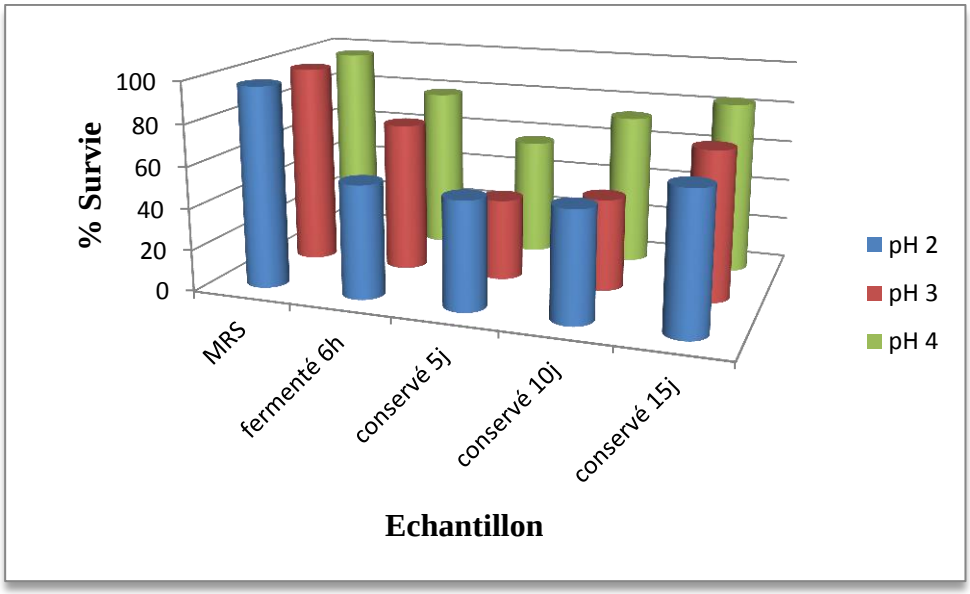


Figure 30 : Taux de survie de *L.plantarum* au différents pH.

Au cours de la conservation,il apparait que le taux de survie augmente sur l'ensemble des milieux aux différents pH, cela dit, la froid n'a pas affecté cette propriété probiotique de *L.planatrum*. Par ailleurs, le nombre de cellules viables évalué a montré une concordance des résultats avec ceux de l'effet pH du milieu.

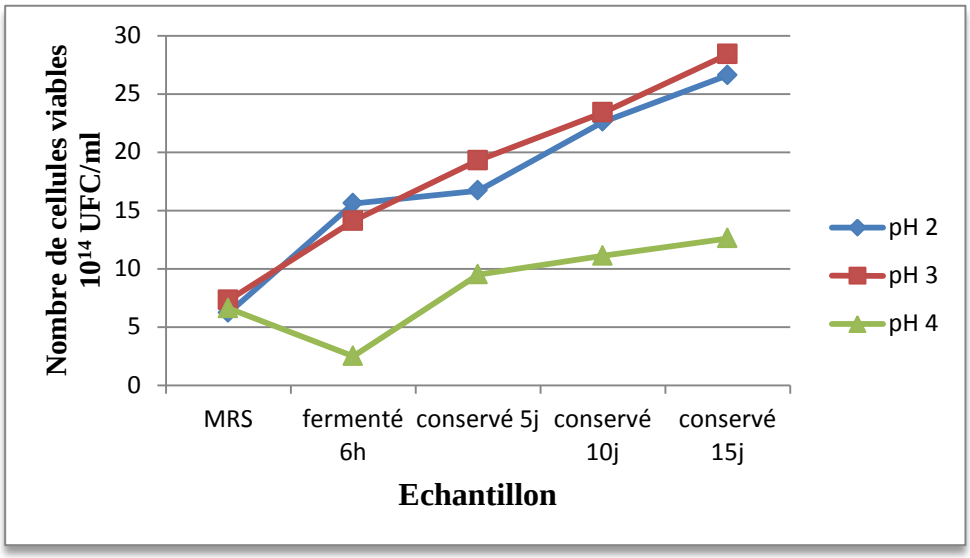


Figure 31 : Nombre de cellules viables au cours de stockage à différents pH.

Conclusion

De nos jours, les produits alimentaires de santé sont au cœur de la recherche, qui est centrée sur la satisfaction de la demande des consommateurs, par la mise sur le marché d'un nombre aussi important de produits à base de probiotiques. Ces produits ont eu la confiance du publique à travers le monde, vu leurs effets bénéfiques déjà prouvés. Ces produits, en véhiculant les cellules bactériennes viables contribuent au maintien de la santé du tube digestif dont dépond largement la santé du corps.

Le but de notre étude était d'évaluée la viabilité et quelques performances probiotiques *in vitro* de la souche *L. plantarum* après son ré-isolement du jus de concombre fermenté.

Dans une première partie, nous avons évalué la qualité du jus de concombre par la détermination des différents paramètres physicochimique et microbiologique, et le suivi de la viabilité de notre souche dans le jus lors de la fermentation et la conservation. Nos résultats ont montré que le jus est de bonne qualité et que la souche se développe facilement dans cette matrice alimentaire et arrive à produire des changements de composition.

Dans une deuxième partie, il était question de ré-isoler la souche de son milieu et ré- examiner ses aptitudes probiotiques, les résultats obtenus *in vitro*, sont particulièrement intéressants où la souche a montré une tolérance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles à savoir envers l'acidité, les sels biliaires et les bas pH. Notre bactérie est capable de co-agréger avec les souches pathogènes, auto-agréger et synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne tel que l'acide lactique, elle a montré également une hydrophobicité qui nous a permis de la caractériser d'hydrophile, et une bonne aptitude d'adhésion aux cellules épithéliales et au mucus.

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

- L'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision de la viabilité des cellules lors de la fermentation
- Une évaluation *in vivo* de l'effet de l'administration du jus de concombre sur par exemple le statut lipidique des rats ou souris (prévention des maladies coronariennes).

Références

A

Anandharaj,M., Sivasankari,B., Santhanakaruppu,R., Manimaran,M., Rani,R.P., and 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*, 33,1-12.

Anila,K., Kunzes,A., and Bhalla,T.C.(2016). *In vitro* Cholesterol Assimilation and Functional Enzymatic Activitiesof Putative Probiotic *Lactobacillus sp* Isolated From Fermented Foods/ Beverages of North West India. *Nutrition & Food Sciences, 6*, 1-5.

AOAC.(2000).*official Methods of Analysis*.17th ED. Maryland.U.S.A.360.

B

Babajide, J.M., Olaluwoye, A.A., Taofk Shittu, T.A.,and Adebisi, M.A.(2013). Physicochemical Properties and Phytochemical Components of Spiced Cucumber-Pineapple Fruit Drink. *Nigerian Food Journal*,30, 40-52.

Baillif,S., Hartmann,D., Freney,J., and Kodjikian,L.(2010). Implant interaoculaire et adhesion bactérienne: influence des conditions environnementales, des proprieties bactériennes et des caractéristiques du biomatériau.*Journal francais d'Ophtalmologie*, 33, 210-221.

Bartkiene,E., Bartkevics,V., Starkute,V., Zadeike,D., and Joudeikiene,G. (2016). The Nutritonal and Safety Challanges Associated with Lupin Lacto-Fermentation. *Forntiers in Plant Science*, 7, 1-4.

Belguedj,M.(2002). Etude du marché des dattes, évaluation du secteur des dattes en Algérie.

Borges,S., Silva,J., and Teixeira,P.(2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet*,289, 479-489.

Bouridane,H., Sifour,M., Idoui ,T., Annick L., and Thonard,P.(2016). Technological and Probiotic Traits of the Lactobacilli Isolated From Vaginal Tract of the Healthy Women for Probiotic Use. *Irannian Journal of Biotechnology*, 14, 192-101.

Breidt F., and Caldwell,J.M.(2011). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Cucumber Fermentation Brines. *Journal of Food science*,76, 198-203.

C

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

Champagne, C., Mocineau,S., Lafleur,S&Savard,T. (2017). The effect of bacteriophages on the acidification of a vegetable juice medium by microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*,63, 28-34.

Collado, M .C. , and Meriluoto, J.(2008) . Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains**.** *Eur Food Res Technol***,** 226**,** 065–1073**.**

D

Diana,C.G., Humberto,H., and Jorge,Y.F.(2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. *Probiotics & Antimicro*. Prot,7,107–117.

Dias,F.S., Duarte,W.F., and Schwan,R.F.(2013). E valuation of adhesive properties of persumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* starins. *Bioxi.Journal*, 29, 1678-1686.

Dimitrovski,P., Velickova,E., Langerholc,T.,and Winkelhausen,E. (2015). Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS 26 strain. *Annual Microbiology*, 65, 2161-2170

Dubois,M., Gilles,K.A., Hamillon,J.K., Rebers,P.A.T., **and Smith,F.(1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*,28, 350-356.

E

Ekmekçi,H., Aslim,D., and Darilmaz,D.O.(2009). Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal Lactobacilli isolated from turkish women. *Arch. Biol. Sci*., Belgrade, 61, 407-412.

Enwa,F.O.(2014). A Mini Review on The Microbiochemical Properties of Sauerkraut. *African Journal of Science and Research*, 3,15-16.

Escudero-López,B., Cerrillo,I., Gil-Izquierdo,A., Hornero-Méndez,D., Herrero-Martín,G., Bern, G., Medina,S., Ferreres,F., Martín,F., and Fernández-Pachón,M.(2016). Effect of thermal processing on the profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of fermented orange juice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*,67, 779-789.

Ezema,C.(2013). Probiotics in animal production :A review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* ,5, 308-316.

F

Ferrando,V., Quiberoni,A., Reinheimer,J., and Suarez,V.(2016). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains : A Study *in vitro* of heat Stress influence. *Food Microbiology, 54*, 154-161.

Foschi,C., Laghi,L., Parolin,C., Giordani,B., Compri,M., Cevenini,R., Marangoni,A and Vitali,B.(2017). Novel approches for the taxonomic and metabolic characterization of Lactobacilli : Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and H-NMR. *Plos one,12*, 1-18.

Franco,W., and Perez-Diaz,A.(2012). Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 114,161-172.

G

García-Cayuela,T., Korany,A.M., Bustos,I., Cadiñanos,L.P.G., Requena,T., Peláez,C.,& Martínez-Cuesta, C.(2014). Adhesion abilities of dairy Lactobacillus plantarum strains showing an aggregation phenotype. *Food research international*, 57,44-50.

Gogineni,V.K., Monow,L.E., and Malesker,M.A.(2013). Probiotics : Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Probiotics & Health,* 1, 1-11.

Goldstein,E.J.C., Tyrrell,K.L., and Citron,D.M.(2015). *Lactobacillus* species : Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical infectious Diseases, 60*, 98-107.

Guiraud,J.P., and Rosec,J.P.(2004). Pratique des normes en microbiologie alimantaire.AFNOR.

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, 91–97**.**

Hertzbzrger,R., Arents,J., Dekker,H.L., Pridmore,R.D., Gysler,C.,Kleerebezem,M., and Mattos,M.J.T. (2014). H_2O_2 Production in Species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Jornals ASM.org,*80, 2229-2239.

I

Idoui,T., Boudjerda,J., Leghouchi,E., and Karam,N.E.(2009). Lactic acid bacteria from "sheep's Dhan". A traditional butter from sheep's milk: identification and major technological traits. *Gr.y.aceites,*60,177-183.

Idoui,T.(2013). Changes of Microbial Population and Some Composition in Carrot Juice During Fermentation With Selected Autochthonous *Lactobacillus Plantarum* Strains. *Turkish Online Journal of Science & Technology,*3.

K

Kaewnopparat,S., Dangmanee,N., Kaewnopparat,N., Srichana,T., Chulasiri,M., and Settharaksa,S.(2013). *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Clinical microbiology,* 333,1-8.

Kareem,K.Y., Ling,F.H., Chwen,L.T., Foong,O.M., and Asmara,S.A.(2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut pathogens,*6, 1-7.

Kaur,S. , Kaur,H.P., and Grover,J.(2016). Fermentation of Tomato juice by Probiotic Lactic acid bacteria. *International Journal of Advances in pharmacy, Biology and chemistry,*5, 212-219.

kechagia,M., Basoulis,D., Konstantopoulou,S., Dimitriadi,D., Gyftopoulou,K., Skarmoutsou,N and Fakini,E.M.(2013). Health Benefits of Probiotics : A Review. *Hidawi Publishing Corporation, 2013,*1-7.

Khandpur P. , and Gogate,P.R.(2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29,337-353.

Khlifa,M., Bahloul, A., and Kitan,S.(2013). Determination of Chemical Composition of Carob Pod (Ceratonia Siliqua L) and its Morphological Study. *J. Mater. Environ. Sci*, 4,348-353.

Kjeldhal J.(1883). Meue method lurk besyimmung des offs in organischem.

Kos,B., Suskovic,J., Vukovic,S., Simpraga,M., Frece,J., and Matosic,S.(2005). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*,94, 981-987.

Kumar,D.A., Anusha,S.V., Oruganti,S., Deshpande,M., Zehra,A., and Tiwari,A.k.(2015). Raw versus cooked vegetable juice Effect on parameters of glycaemic overload and oxidative stress *in vitro. Natura food*, 2, 1-12.

Kumar,R., Arora,S., and Singh,S. (2016). Formation and Developpement of Herbal cucumber Gel For Sunscrren and Anti-oxidant Activities. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 747-758.

L

lavenil,S., Park,S.H., kumar,M.V., Arasu, M.V., Kim,D.H., kumar,S.R., and Choi, K.C.(2015). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antifungal Activity Isolated from Animal Manure **.** *The ScientificWorld Journal*, 2015,1–10**.**

Lavinia,B.C., Manea,I., Bratu,M.G., Avram,D., and Nicolescu,C.L.(2012). Evaluation of the cabbage and cucumber juices as substrate for *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7418-7429.

Lecoq R.(1965). Manuel d'analyses alimantaires et expertise usuelles. *Doin*. Paris.1304-1311.

Liawruangrath,P., Liawruangrath,B., and Liawruangrath,S.(2015). Determination of organic acids in avocado Fermented Juice by high performance Liquid Chromatography. *chiany Mai Journal Science*,42, 208-215.

Lin,T.Y., and Chien,M.F.C.(2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria. *Food Science And Technology-New York- Marcel Dekker*,139,175-198.

Liu,F., Zhang,X., Zhao,L., Wang,Y., and Liao,X.(2016). Potential of high-pressure processing and high-temperature/short-time thermal processing on microbial, physicochemical and sensory assurance of clear cucumber juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,34,51-58.

Lu,Z., Fleming,H.P., and MCFeeters,R.F.(2002). Effects of Fruit Size on Fresh Cucumber Composition and the Chemical and Physical Consequences of Fermentation. *Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2934-2939.

M

Martinez,F.A.C., Balciunas,E.M., Salgado,J.M., Gonzalez,J.M.d., Converti,A., and Oliveira,R.P.S.(2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science and Technology*, 30,70-83.

Melgar-Lalanne,G., Rivera-Espinoza,Y., Farrera-Rebollo,R., and Hernandez-Sanchez,H.(2014). Survial under stress of halotolerant Lactobacilli with probiotic properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*,13,323-335.

Mukherjee.P.K., Nema.N.K., Maity,N., and Sarkar,B.K.(2013). Phytochemical therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia*, 84, 227-236.

N

Nami,Y., Abdullah,N., Haghshenas,B., Radiah,D., Roshi,R., and Khosroushahi,A.Y.(2014). Assessement of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. *Microbiology and Immunology, 58*, 492-502.

Nivoliez,A.,Veisseire,W .,Alaterre,E., Dausset,C., Baptiste,F ., Camarès ,O., Paquet-Gachinat,M., Bonnet,M., Forestier,C., and Bornes,S.(2015). Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Appl Microbiol Biotechnol*,99:399–411.

Nosrati,R., Hashemiravan,M.,and Talebi,M.(2014). Fermentation of vegetables juices by probiotic bacteria. *International Journal of Bioscience*, 4, 171-180.

O

Organisation Mondiale de la santé.(2002). Stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments: Une alimentation à moindre risqué pour une meilleur santé: Génève; 28p.

P

Pandya, D. (2016). Benefits of Probiotics in Oral cavity–a Detailed Review. *Annals of dàçdsInternational Medical and Dental Research, 2*, 10-17.

Park,S ., and Lim,S.(2015). Probiotic Characteristics of *Lactobacillus plantarum* FH185 Isolated from Human Feces. *Korean J. Food Sci. An*,35, 615-621.

Pauwels,J. M., Ranst,E.V., Verloo,M., andMvondo,Z. A., (1992). Manuel de laboratoire de pédologie. Publications Agricoles, Brussels.

Peres,C.M., Peres,C., Andez-Mendoza,F., and Malcata,F.X.(2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria e With an emphasis on table olives. *Trends in food science & technology*, 26,31-42.

Perez,H., Perez,M.T.M., and Elegado,F.B.(2015). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Production, Uses, and Prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology* , 8,61-67.

Polak-Bereck,M., Wasko,A., Paduch,R., Skrzypek,T., and Sroka-Bartnicka,A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek*,106:751–762.

R

Re,B.D., Sgorbati,B., Migliolo,M., Palenzona,D.(2002). Adhésio, autoaggregation and hydrophobicity of 13 starins of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*,31, 438-442.

S

SADOK,S., HASSEN,A., and BOUSAID,B.(2015). Evaluation de la qualité des huitres creuses crassostrea gigas au cours du stockage réfrigéré : suivi de viabilité cellulaire. Scien. Tech. Mer de Salammbô, 42,87-90.

Sarkar,S.,Asur,A.,Sarkar,K.,Majhi,R.,Basu,S.,Chatterjee,K., and Sikder,B.(2016). Probiotics : Away of Value Addition in Functional Food. International *journal of Food Science,Nutrition and Dietetics*,5, 290-293.

Satpute,S.K., Kulkarni,G.R., Banpurkari,A.G., Banat,I.M., Mone,N.S., Patil,R.H., and Cameotras,S.S.(2016). Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*,56,1-19.

Savedboworn,W. , Charoen,R., and Phattayakorn,K.(2014). Growth and Survival Rates of *Lactobacillus plantarum* in Thai Cereal Cultivars. *KMUTNB Int J Appl Sci Technol*, 7, 49-61.

Schillinger,U., Guigas,C., and Holzapfel,W.H.(2005). *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. International dairy products,15, 1289-1297.

Sharma,V., and Mishra,H.N.(2013). Fermentation of vegetable juice mixture by probiotic lactic acid bacteria. *Natura food*, 12, 1-5.

Shekh, S. L., Dave, J . M., and Vyas, B. R .M.(2016) . Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and g-amino butyric acid production**.** *LWT - Food Science and Technology*,74, 234-241**.**

Stoyancheva,G., Marzotto,M., Dellaglio,F., and Torriiani,S.(2014). Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*,196, 645-653.

Succi,M.,Tremonte,P., Reale,A., Sorrentino,E., Grazia,L., Pacifico,S., and Coppola,R.(2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters*,244, 129-137.

T

Taale,E., Savadogo,A., Sina,H., Zongo,C., Karou,S.D., Baba-Moussa.L., and Traore,A.S.(2016). Searching For Fermented Food in Burkina Faso By Molecular Methods. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7, 86-94.

Talbi,H., Boumaza,A., El-Mostafa,K., and Hilali,A.(2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa L.*). *Mater. Environ. Science.*6 ,1111-1117.

Tamang,J.P., Shin,D., Jung,S., and Chae,S.(2016). Fonctional Properties of Microorganisms in fermented Foods. *Frontiers in Microbiology, 7*.

Tamang,J.P., Shin,D., Jung,S., and Chae,S.(2016). Functional properties of microorganisms in feemanted foods. *Frontiers in microbiology*, 7, 1-13.

Todorov,S.M. , and Franco,B.D.G.M.(2010). *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International,*26, 205-229.

Tomas,M.S.J., Wies,B., Nader-Macias,M.E.(2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of applied microbiology*,99, 1383-1391.

Tripathi,M.K., and Giri,S.K.(2014). Probiotic Functional Foods :survial of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.

Tufarelli,V., and Laudadio,V.(2016). An overview on the functional food concept: prospective applied resesrches in probiotics, prebiotics and synbiotics. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences,*4,273-278.

Tyagi,S., Saha,A., Gupta,R.K., and Tyagi y.(2016). Guar Gum Based Edible Coating On Cucumber (*CUCUMIS SATIVUS* L.). *European Journal of Pharmaceutical and Medical Reserch*,3, 558-570.

y

Yepez,L., and Tenea,G.N.(2015). Genetic diversity of lactic acid bacteria strains towards their potential probiotic application. *Romanian Biotechnological Letters, 20*, 10191-10199.

z

Zhao,L., Wang,S.,Liu,F.,Dong,P., Huang,W., Xiong,L., and Liao,X.(2013). Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17,27-36.

Zhao,L., Wang,Y., Wang,S., Li,H., Huang,W., and Liao.X. (2014). Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatement. *International Journal of Food Microbiology*,174, 12-18.

Zielinska,D., Rzepkowska,A., Radawska,A., and Zielinski.S.(2015). *In Vitro* Screening of Selected Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Fermented Cabbage and Cucumber. *Curr Microbiol*,70:183–194.

Annexes

Annexe 1 : composition des milieux de cultures et tampons

- **Eau physiologique**

Ingrédients	Unité
NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

- **Tampon phosphate saline (PBS)** pH= 7.2

Ingrédients	Unité
K_2HPO_4	1.21g
KH_2PO_4	0.34g
NaCl	8 g
Eau distillée	1000 ml

- **Tampon phosphate urée magnésium** pH= 7.1

Ingrédients	Unité
K_2HPO_4 $3H_2O$	22.2g
KH_2PO_4	7.26g
Urée	1.8g
$mgSO_4$	0.2g
Eau distillée	1000 ml

- **Bouillon Man-Rogosa-Sharpe (MRS)** pH= 5.8

Ingrédients	Unité
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000 ml

- **Bouillon Luria-Berteni :**

Ingrédients	Unité
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000

1. Composition des milieux de cultures et tampons :

❖ ***Gélose nutritive* :**

Ingrédients	**Unité**
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

❖ ***Gélose oxytétracycline-Glucose-Agar*** *(OGA) :*

Ingrédients	**Unité**
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Oxytétracycline	0.1g
Agar Agar	15g

2. résultats des paramètres physico-chimiques :

- **pH du jus lactofermenté au cours de fermentation :**

Temps	A T0h	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 8h	Après 10h	Après 12h
pH	5.13	4.94	4.81	4.37	3.95	3.95	3.68

- **Acidité du jus lactofermenté aau cours de fermentation :**

Temps	A T 0h	Après 2h	Aprés 4h	Après 6h	Après 8h	Après 10h	Après 12h
°D	14.5	15	16.5	19.5	40	44	49

- **pH et acidité de jus lactofermenté après conservation :**

Echantillon	Après 5j	Après 10j	Après 15j
pH	3.47	3.07	3.03
°D	6.61	65.5	47

- **La cinétique de croissance de nus lactofermenté au cours de fermentation :**

Temps	A T0h	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 8h	Après 10h	Après 12h
DO(nm)	0.4	0.72	0.72	1.63	2.00	1.84	1.84

- **La cinétique de croissance de jus lactofermenté après conservation :**

Echantillon	5 jours	10 jours	15 jours
DO (nm)	0.96	0.98	1.44

- **La densité de jus lactofermenté au cours dela fermentation :**

Temps	A T0h	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 8h	Après 10h	Après 12h
Densité (g/cm^3)	93.87	94.77	93.89	93	92.63	92.38	91.80

- **La densité de jus lactofermenté après conservation :**

Echantillon	Après 5j	Après 10j	Après 15j
Densité (g/cm^3)	0.9	0.9	0.81

- **La teneur en vitamine C :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Vit C (mg/l)	7.15	5.10	4.18	3.63	3.34

- **Teneur en matière minérale :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
% MS	5.2	5.1	4.7	4.2	2.6

- **Teneur en cendres :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
% MM	2.5	1.9	1.6	1.3	1.1

- **Teneur en sucres totaux :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Sucres totaux (µg/ml)	3.68	3.32	3.29	3.17	2.57

- **Degré Brix :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
°Brix	3.2	2.3	2.6	3.25	3.5

- **La teneur en matière azoté et en protéines :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Matière azoté (g/kg)	0.48	0.48	0.48	0.47	0.49
Protéines (g/kg)	3.05	3.03	3.01	2.96	2.29

- **Polyphénols totaux :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Polyphénols totaux (mgEAG/ml)	450	315	282	193.3	139.3

- **Teneur en éléments minéraux :**
  - **Teneur en potassium :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Teneur en K (mg/100ml))	126.5	136	106	133	137

  - **Teneur en sodium :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Teneur en Na (mg/100ml)	534.8	583.4	412.4	623.6	548.1

- **Teneur en métaux lourds (zinc et cuivre) :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Zn	0.223	0.136	0.572	0.945	0.176
Cu	0.018	0.067	0.031	0.036	0.06

- **Teneur en flavonoïdes :**

Echantillon	Brut	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Flavonoïdes en µg/ml	411.86	412.53	365.44	344.53	182.64

❖ **Nombre de cellules au cours de la fermentation :**

Temps	A T0h	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 8h	Après 10h	Après 12h
Nombre de cellules x10^{14} UFC/ml	1.2	4.5	7.9	10.6	10.9	16.9	19.9

❖ **Nombre de cellules après conservation :**

Echantillon	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Nombre de cellules x 10^{14}UFC/ml	13.9	13.1	12.1

2. Résultats des aptitudes probiotiques :

❖ Hydrophobicité au cours de fermentation :

Echantillon	MRS	Fermenté 6h
Xylène	5.3	8.33
Chloroforme	11.19	20.13
Toluène	11.94	28
Ethyle acétate	16.15	10.3

❖ Hydrophobicité après conservation :

Echantillon	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Xylène	22.97	12.12	17.15
Chloroforme	24.34	28.12	5.46
Toluène	25.17	18.47	21.98
Ethyle acétate	37.22	28.88	17.42

❖ Nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales et au mucus au cours de la fermentation :

Echantillon	**MRS**	**Après 6h**
Nombre adhérés aux cellules épithéliales	105	102
Nombre adhérés au mucus	77	108

❖ Nombre de cellules adhérées aux cellules épithéliales et au mucus après conservation :

Echantillon	**Conservé 5j**	**Conservé 10j**	**Conservé 15j**
Cellules épithéliales	**72**	**56**	**20**
Mucus	**88**	**36**	**20**

❖ L'auto-agrégation du produit fini et après conservation :

Echantillon	**MRS**	**Fermenté 6h**	**Conservé 5j**	**Conserva 10j**	**Conservé 15j**
Auto (%)	**8.33**	**7.4**	**49.27**	**18.13**	**12.14**

❖ La Co-agrégation du produit fini et après conservation :

Echantillon	MRS	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
E.coli	51.65	53.45	47.14	41.44	61.96
S.aureus	53.33	55.07	44.63	45.5	66.08
B.subtilus	49.03	77.83	81.71	45.7	58.72

- **Tolérance aux sels biliaires :**

- **Taux de survie :**

Echantillon	MRS	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
% survie	52.29	82.11	47.56	41.11	65

- **Nombre de cellules :**

Echantillon	MRS	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
Nombre de cellules x10^{14}UFC/ml	17.7	27.1	30.1	8.3	13.3

- **Tolérance aux pH gastriques :**

- **Taux de survie :**

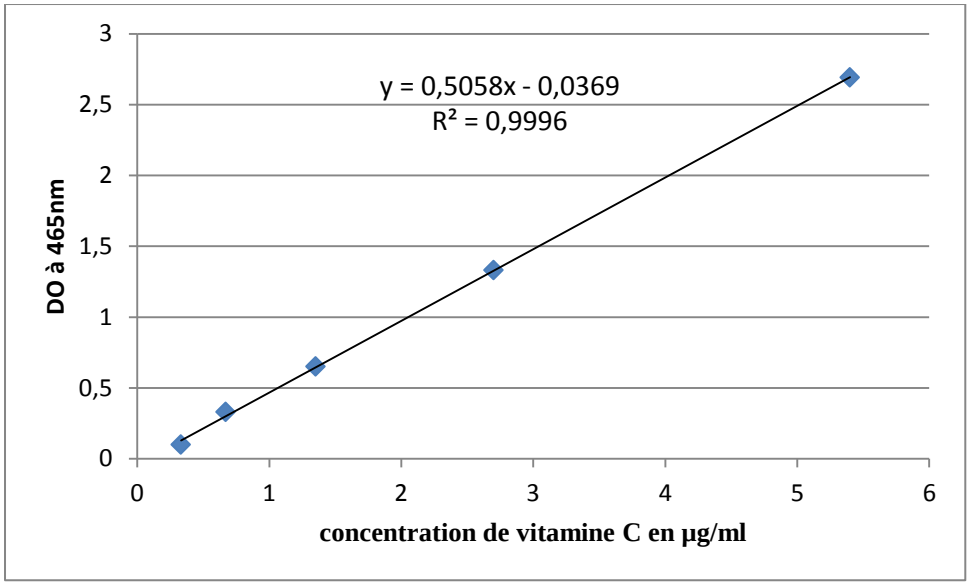
Echantillon	MRS	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
pH 2	54.65	95.65	52.17	53.03	66.83
pH 3	71.93	95.65	39.13	44.19	71.78
pH 4	78.57	95.65	56.52	72.92	83.16

- **Nombre de cellules (x10^{14}UFC/ml):**

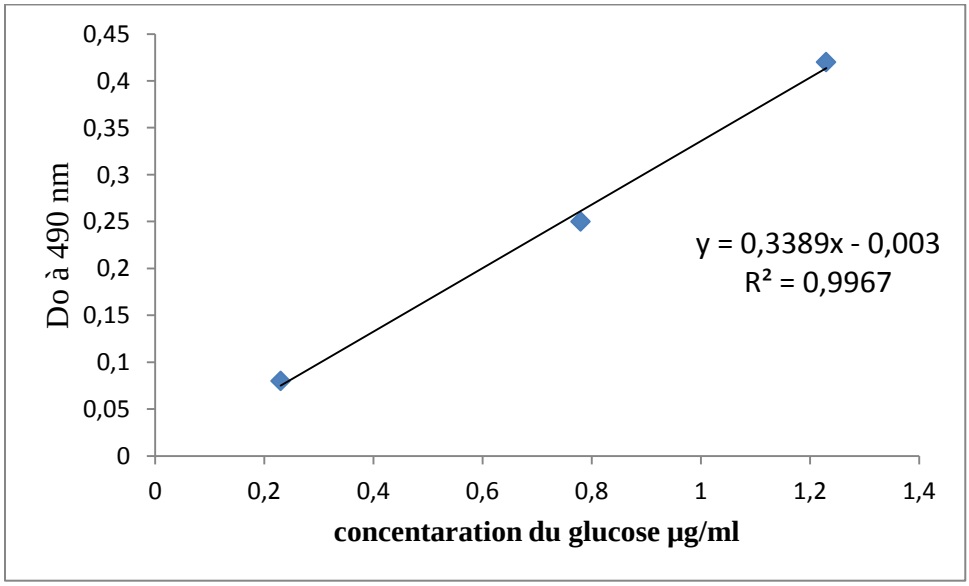
Echantillon	MRS	Fermenté 6h	Conservé 5j	Conservé 10j	Conservé 15j
pH 2	6.2	15.6	16.7	22.6	28.6
pH 3	7.3	14.1	19.3	23.4	26.6
pH 4	6.6	2.5	9.5	11.1	12.6

Les courbes d'étalonnages utilisées :

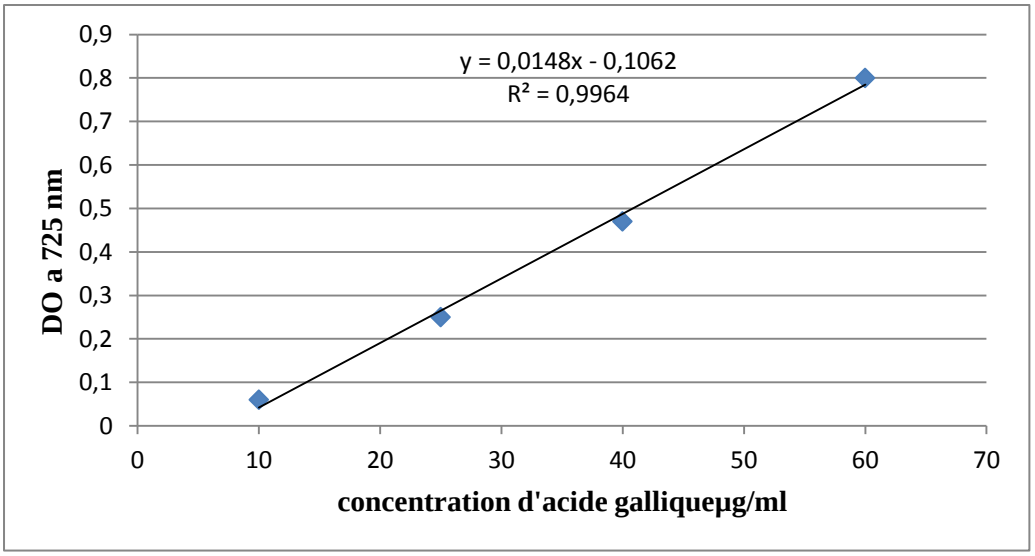
- **Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique :**



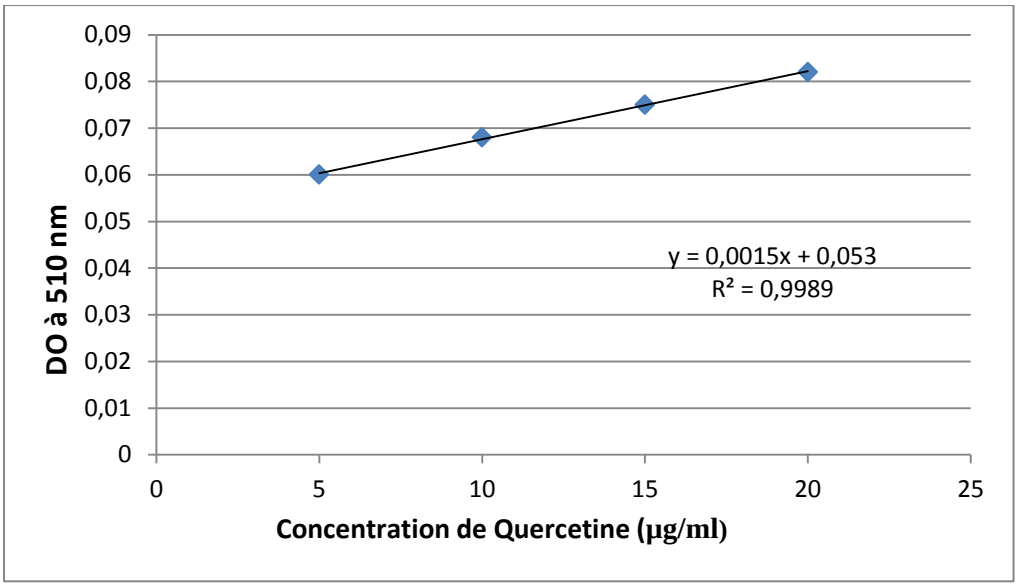
- **Courbe d'étalonnage des sucres totaux (glucose) :**



- **Courbe d'étalonnage pour les composés phénoliques (acide gallique)**



❖ **Courbe d'étalonnage des flavonoïdes** (Quercetine)**:**



Annexe 6: Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Fixer la culture bactérienne sur une lame à la chaleur.
- Recouvrir la lame avec le violet de gentiane pendant une minute.
- Ajouter du Lugol pour une minute.
- Décolorer avec l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rincer à l'eau.
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Après séchage soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries Gram positif apparaissent en violet et les Gram négatif apparaissent en rose.

Réalisé par : Boumeslat Meriem
Nettour Samah

Encadreur : Idoui T.

Date de soutenance : 02-07-2017

Thème: Evaluation de la viabilité des performances probiotiques de *lactobacillus plantarum* sur jus de concombre fermenté *in vitro*.

Résumé

Le but de notre travail est de déterminé la qualité de jus de concombre fermenté par *L.plantarum* et d'évaluer *in vitro* certaines propriétés probiotiques après son ré-isolement de cette matrice alimentaire.

Les résultats ont montré que le jus de concombre fermenté est de bonne qualité et que la souche a une bonne activité le long de la période de conservation. Après son ré-isolement du jus de concombre fermenté et examen de ses aptitudes probiotiques, les résultats ont montré qu'elle a une bonne tolérance à l'acidité, aux sels biliaires, avec une bonne adhésion au tissu épithélial et au mucus, elle donne de bons résultats d'auto-et de co-agrégation. Enfin, le jus de concombre améliore les aptitudes de la souche.

Mots clés : *L.plantarum*, jus de concombre, qualité, probiotique.

.

Abstract

The aim of our work is to determine the quality of cucumber juice fermented by *L.plantarum* and then evaluate *in vitro* some probiotic properties after its re-isolation from this food product.

The results showed that the fermented cucumber juice have a good quality and the strain has a good activity along the storage period. After re-isolation of the strain from the fermented cucumber juice and examination of its probiotic traits, the results showed that it has good tolerance to acidity, bile salts, with good adhesion to epithelial cells and mucus. It shows good percentage of auto and co-aggregation. Finally, cucumber juice improves the strain's aptitudes.

Key words : *L.plantarum*, cucumber juice, quality, probiotic.

ملخص:

الهدف من دراستنا هو تحديد جودة ونوعية عصير الخيار المخمر ببكتيريا اللاكت باسيلوس ومتابعة خارج الخلية لبعض الخصائص البروبروتيكية بعد اعادة عزلها من خلال هده المادة الغذائية .

النتائج انبثت بان عصير الخيار المخمر دو جودة ونوعية و أن البكتيريا ذات نشاط جيد طول مدة حفظ العصي.رجيدة.بعد اعادة عزلها من عصير الخيار المخمر ودراسة كفاءتها البروبروتيكية.النتائج اثبثت بان لديها مقاومة جيدة للحموضة والأملاح المعوية. قدرة جيدة على الالتصاق بالخلايا المعوية و المخاطية. كما انها اعطت نتائج جيدة بالنسبة للالتصاق الداتي .وفي الاخيرأن لعصير الخيار قدرة على تحسين كفاءة السلالة .

.

الكلمات المفتاح. الكفاءة البروبيوتيكية، قابلية النمو، الخاصية الهيدروفوبية، الإلتصاق الداتي، الخلايا المعوية، الأملاح المعوية.