

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2428

Université Mohammed Seddik Benyahia – Jijel

Faculté des Sciences de Nature et de la Vie

Département: Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation de l'effet de la matrice alimentaire (cas de jus de carotte) et la conservation sur la viabilité des *Lactobacillus* et leurs aptitudes probiotiques

Membres de Jury

Président : M^r. Boubezari. T

Examineur : M^r. Boudjerda. D

Encadrant: D^r. Idoui. T

Présenté par :

M^{lle} : Boubezari ìmene

M^{lle} : Boubendir asma

Années Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciement

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 adressons nos remerciements tout d'abord à notre encadreur «Mr Idouï Tayeb», pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Nos remerciements vont également aux membres de jury Mr Boubezari .T et Mr Boudjerda .j D'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à monsieur Khennouf .T pour les aides et les informations qu'ils ont bien voulu de nous fournir.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie pour sa collaboration

Un très grand merci pour nos chers parents qui ont été la pour nous, nos frères, nos sœurs et à nos amies pour leur encouragement

Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Asma & imene

A decorative orange scroll border frames the page. It starts with a small scroll at the top left, goes right, then down, then left, and finally up to a larger scroll at the bottom left. The word 'Sommaire' is centered within this frame.

Sommaire

Introduction.....1

Partie I : étude bibliographique

Chapitre I : généralité sur les probiotiques

L1 Définition du terme probiotique3

L2. Les souches probiotiques.....3

L2.1. Le genre *Lactobacillus*.....4

L2.1.1.L'espèce *Lactobacillus rhamnosus* et les bienfaits.....5

L3.Critères de sélection des probiotiques..... 5

L4. Mode d'action des probiotiques.....6

L4.1. Production des substances antimicrobiennes et inhibition des pathogènes7

L4.1.1. Les bactériocines.....7

L4.1.2. Le peroxyde d'hydrogène.....7

L4.1.3. Les biosurfactants7

L4.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène8

Chapitre II: Les probiotiques dans les produits alimentaires

II.1. Les produits fermentés 10

II.2. Les jus lacto-fermenté d'origine végétale.....10

II.3.Viabilité des bactéries probiotiques dans les produits alimentaires.....10

II.4. Les principaux facteurs qui devrait être considère dans le développement des probiotiques dans l'aliment.....11

II.4.1. Les propriétés biologiques.....11

II.4.2.La sélection technologiques.....11

II.4.3. La toxicité.....12

II.4.4. La stabilité pendant le stockage.....12

II.4.5. Le pH.....12

II.4.6. L'oxygène.....12

Partie II : étude expérimentale

II. Matériel et Méthodes	13
II.1. Matériel	13
II. 1. 1. Matériel biologique	13
II.1.2. Les milieux de culture	13
II.1.3. Produits chimiques et réactifs	13
II.1.4. Appareillages	14
II.2. Méthodes	14
II.2.1. Revivification des souches	14
II.2.2. Préparation des échantillons	14
II.2.2.1. Préparation de lait	14
II.2.2.2. Préparation de jus de carotte	14
II.2.2.3 .Préparation de jus de carotte lacto-fermenté	14
II.2.3. Le contrôle du lait fermenté (starter)	15
II.2.4. Contrôle de jus de carottes lacto-fermenté	16
II.5. Le contrôle des paramètres physico-chimique	17
II.5.1. Dosage de la vitamine C (titrage direct)	17
II.5.2. Détermination de la matière sèche (MS)	17
II.5.3. Détermination de la matière minérale	17
II.5.4. Dosage des sucres totaux	18
II.5.5. détermination de la teneur en protéines (Kjeldahl, 1883)	18
II.5.6. Dosage des polyphénols totaux	19
II.6. Contrôle microbiologique	19
II.6.1. préparation des dilutions décimales	19
II.6.2. Recherche et dénombrement des levures et moisissures	19
II.6.3. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophiles (FTAM)	20
II.7. Evaluation des aptitudes probiotiques	20
II.7.1. Test d'hydrophobicité	20
II.7.2. Adhésion in vitro au tissu épithélial	21
II.7.3. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation	21

Partie III : Résultats et Discussion

III.1. Evolution de pH et de l'acidité des cultures starters.....	23
III .2. Evolution du pH et l'acidité au cours de la fermentation du jus de carottes et après conservation.....	23
III 3. Evaluation du nombre de cellules au cours de fermentation, du produit fini et après conservation.....	27
III .4. Contrôle des paramètres physico-chimique.....	28
III.4.1. Teneur en vitamine C.....	29
III.4.2. Teneur en matière sèche et en cendres.....	29
III.4.3. Teneur en sucres totaux.....	31
III.4.4. Teneur en azote totale et en protéines.....	32
III.4.5. Teneur en polyphénols totaux	33
III.5. Contrôle microbiologique des jus de carottes.....	33
III.6. Evaluation des aptitudes probiotique.....	34
III.6.1. Hydrophobicité	34
III.6.2. Auto/Co agrégation	37
III.6.3. L'adhésion	39
Conclusion	45

Figure	Page
Figure 1 : Mode d'action des bactériocines et des biosurfactants	8
Figure 2. Mécanismes de compétition pour l'adhésion	8
Figure 03. Schéma de la préparation du jus de carottes lacto-fermenté	15
Figure 04: Valeurs du pH des échantillons de jus de carottes au cours de fermentation.	24
Figure 05 : Valeurs du pH au cours de la conservation.	25
Figure 06 : Evolution de l'acidité au cours de la fermentation.....	26
Figure 07: Evolution de l'acidité au cours de la conservation.	26
Figure 08 : Evolution du nombre de cellules bactériennes au cours de la fermentation	27
Figure 09 : Evolution du nombre de cellules bactériennes au cours de la conservation.	28
Figure 10: Teneurs en acide ascorbiques des échantillons de jus.....	29
Figure 11: Teneur en matière sèche des trois échantillons.....	30
Figure 12 : teneur en cendres	30
Figure 13 : Teneurs en sucres totaux des échantillons de jus.	31
Figure 14: Teneurs en azote total et en protéines brutes dans les échantillons de jus.	32
Figure 15 : Teneurs en polyphénols des échantillons de jus	33
Figure 16 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches produit fini avec le témoin.	34
Figure 17 : Pourcentages d'hydrophobicité après une semaine de conservation du produit	36
Figure 18 : Pourcentage d'hydrophobicité après deux semaines de conservation du produit	37
Figure 19 : pourcentage d'auto/co agrégation des cultures du produit fini.	37

Photo	Page
Photo 01 : photo-microscopique des cellules épithéliales.....	40
Photo 02 : photo microscopique d'adhésion de <i>L. rhamnosus</i> S(10) aux cellules épithéliales.....	41
Photo 03 : photo microscopique d'adhésion de <i>L.satsumensis</i> S(13) aux cellules épithéliales	41
Photo 04 : photo microscopique d'adhésion de mixture aux cellules épithéliales	41
Photo 05 : photo microscopique d'adhésion de <i>L. rhamnosus</i> aux cellules épithéliales après une semaine conservation.....	42
Photo 06 : photo microscopique d'adhésion de <i>L.satsumensis</i> aux cellules épithéliales après une semaine conservation	42
Photo 07 : photo microscopique d'adhésion de la mixture aux cellules épithéliales après une semaine conservation	43
Photo 08 : photo microscopique d'adhésion de <i>L. rhamnosus</i> aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation	44
Photo 09 : photo microscopique d'adhésion de <i>L.satsumensis</i> aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation	44
Photo 10 : photo microscopique d'adhésion de la mixture aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation	44

Tableau	Page
Tableau 01 : Microorganismes considérés comme probiotiques	4
Tableau 2 : Principaux critères de sélection des probiotiques	6
Tableau 03 : Résultats du pH et de l'acidité des cultures starters	23
Tableau 04 : Résultats du contrôle microbiologique	34

Liste des abréviations

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
°D :	Degré dornic
DO :	Densitéoptique
FAO :	Food and Agriculture Organization
g/l :	Gramme par Litre
g :	Gramme
h :	Heure
min :	Minute
mg :	Milligramme
mg/ml :	Milligramme/ Millilitre
mol/l :	Mol par Litre
PBS :	phosphate urée sulfate magnésium
S10 :	<i>L. rhamnosus</i>
S13 :	<i>L. satsumensis</i>
SM :	la mixture de
MS :	matière sèche
MM :	matière minérale
N :	Normalité
pH :	potentielle d'hydrogène
UFC/ml :	Unité Formant Colonie par Mililitre
ml :	Millilitre
µl :	Microlitre
MRS :	Man, Rogosa et Sharpe
OGA :	Gélose Glucosée à l'Extrait de Levure et à l'Oxytétracycline
OMS :	Organisation Mondiale de Santé
t :	Temps

A decorative border in a light orange color frames the page. It features rounded corners and two stylized scrollwork elements: one at the top-left and one at the bottom-left, both filled with a light blue color. The border is composed of a single continuous line that forms a large rectangle with rounded corners and two scroll-like protrusions on the left side.

Introduction

Depuis quelques années l'idée d'une relation directe entre une alimentation optimale et un mode de vie sain fait son chemin auprès du grand public. Ainsi les marchés des aliments sains se sont fortement développés afin de répondre à la demande des consommateurs qui cherchent de plus en plus à contrôler leur qualité de vie et leur état de santé à travers une meilleure alimentation. L'hygiène des denrées alimentaires s'impose d'abord dans un but de santé publique. Elle vise à protéger le consommateur contre les dangers des denrées alimentaires insalubres, c'est-à-dire qui ont perdu leurs qualités alimentaires (OMS, 2002).

Depuis la découverte des probiotiques par **Élie Metchnikoff** en 1908, plusieurs tentatives ont été effectuées afin d'incorporer ces microorganismes à l'alimentation. Plusieurs matrices d'incorporation ont ainsi été développées, notamment les yogourts, les boissons, les comprimés, les céréales et la viande (Rivera et Gallard, 2010).

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit (Izquierdo, 2009).

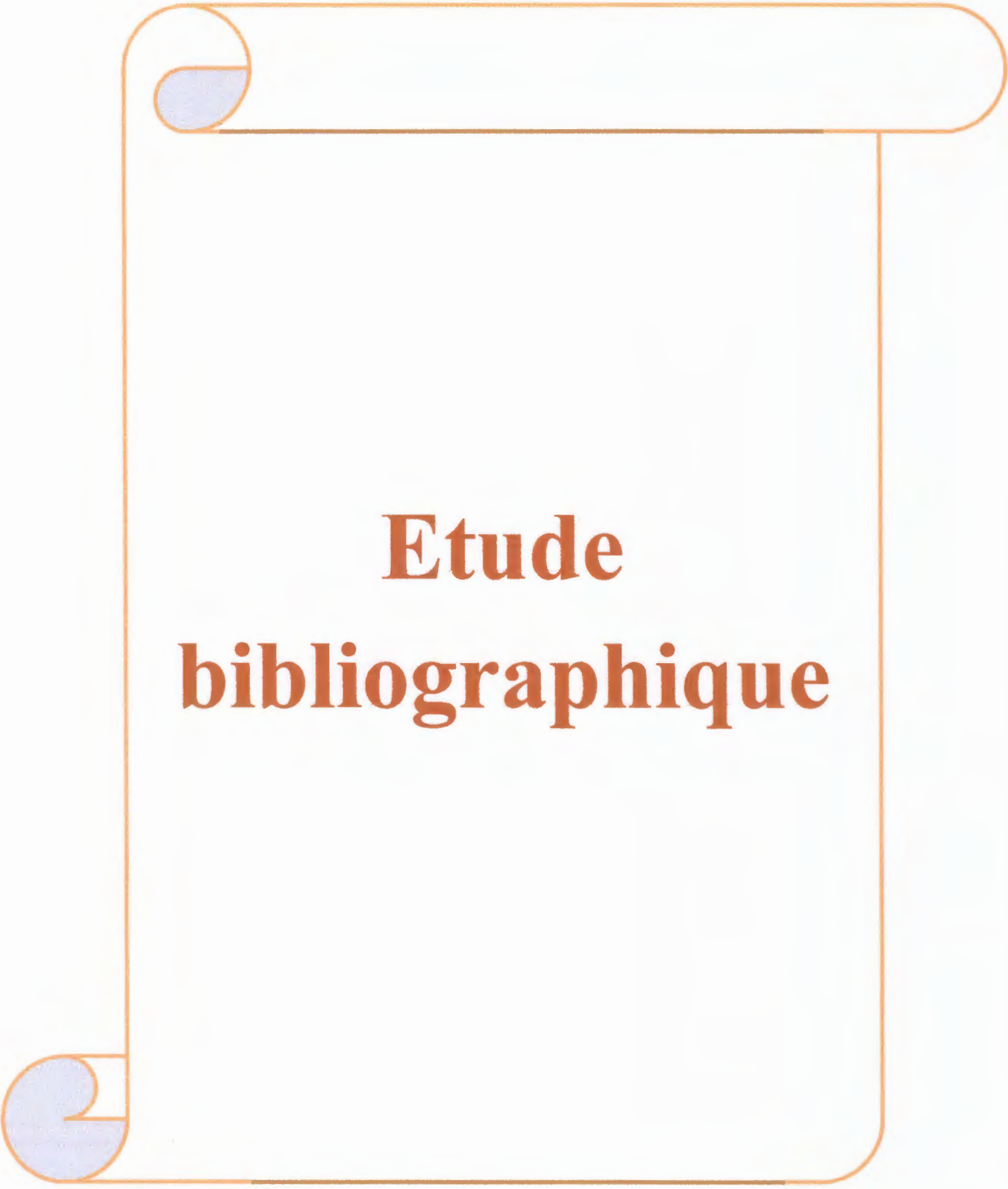
Plusieurs mécanismes ont été proposés par lesquels les probiotiques peuvent exercer un effet bénéfique sur leur hôte ; cependant, l'adhésion à l'épithélium intestinal est considéré comme primordiale ce qui facilite l'élimination des pathogènes (Del Re et al., 2000 ; Dimitrov et al., 2014). Cependant, une deuxième propriété d'intérêt est l'auto-agrégation et la co-agrégation, elles permettent la formation de biofilms sur la surface de la paroi intestinale, empêchant ainsi la colonisation par les microorganismes (Pascuala et al., 2008 ; Pascuala et Barberis 2011).

L'objectif de cette étude est de répondre à la problématique qui a comme intitulé : évaluation de l'effet de la matrice alimentaire et la conservation sur la viabilité des lactobacilles et leurs aptitudes probiotiques.

Ce travail a été accompli en trois parties :

- Une synthèse bibliographique qui va nous permettre en premier temps d'élargir nos connaissances sur les probiotiques, leur mode d'action, les critères de sélections.

- L'ensemble du matériel et des méthodes mis en œuvre au cours de l'étude, Production d'un jus de carottes lacto-fermenté, contrôle des paramètres physicochimiques de la qualité hygiénique de la matière première et du produit fini et à la fin une études des aptitudes probiotiques des lactobacilles.
- Les résultats expérimentaux sont abordés dans la troisième partie. Enfin, la conclusion du travail exposé, permet d'établir le bilan de l'étude et d'annoncer les perspectives qui peuvent en découler.



**Etude
bibliographique**

Chapitre I : Généralités sur les probiotiques

I.1. Définition du terme probiotique

Le terme “probiotique”, issu des termes grecs “pros” et “bios” signifie « Pour la vie » (FAO/WHO, 2001). Il est dérivé du mot latin « pro » (pour) et du mot grec « biotie » (vie) (Singh *et al.*, 2011).

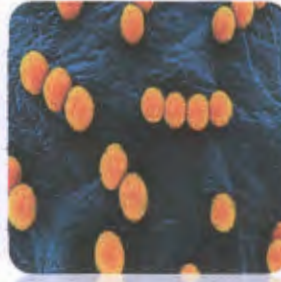
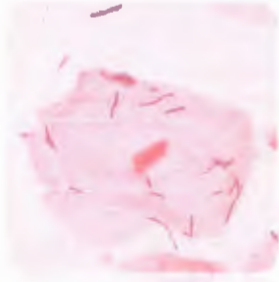
Plus récemment, les probiotiques sont définis comme suit « des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte ». Cette proposition de définition a été adoptée en 2001 par le groupe de travail mandaté par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO pour Food and Agriculture Organization of the United Nations) et par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ce groupe a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et / ou l'activité dans le corps humain (FAO/WHO, 2001)

I.2. Les souches probiotiques

De nombreux genres bactériens sont considérés comme probiotiques, de même que certaines levures. Les genres de bactéries utilisées sont très variables, passant par les lactobacilles, les bifidobactéria, les entérocoques et les streptocoques. Pour les levures, c'est l'espèce *Saccharomyces boulardii* qui est la plus connue (Ouwehand *et al.*, 2002 ; Kailasapathy, 2013). Malgré cette diversité, ce sont les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont les plus étudiés. Le tableau suivant représente les groupes de microorganismes utilisés comme probiotiques

Tableau 1 : Microorganismes considérés comme probiotiques (Saad *et al.*, 2013).

Lactobacilles *Bifidobacterium* *Autres bactérie lactique* *autres*



Lactobacillus acidophilus *Bifidobacterium breve* *Enterococcus faecium* *Sacharomyces. Sp*

L. acidophilus *B. adolescentis* *Enterococcus faecalis* *Sacharomyces cerevisiae*

L. amylovorus *B. animalis* *Enterococcus faecium* *Sacharomyces boulardii*

L. brevis *B. bifidum* *Lactococcus lactis* *E. coli strain Nissle*

L. casei *B. breve* *Leuconostoc mesenteroides*

L. cellobius *B. infantis* *Pediococcus acidilactici*

L. crispatus *B. lactis* *Sporolactobacillus inulinus*

L. curvatus *B. longum* *Streptococcus thermophilus*

L. delbrueckii *B. thermophilum* *Streptococcus diacetylactis*

L. farciminis *Streptococcus intermedius*

L. fermentum

L. gallinarum

L. gasseri

L. johnsonii

L. paracasei

L. plantarum

L. rhamnosus

I.2.1. Le genre *Lactobacillus*: Ce genre regroupe des bactéries à gram positif, des bâtonnets non sporulés, généralement immobiles. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, non pathogènes, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides

aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux. Les lactobacilles forment un groupe hétérogène de bactéries, ubiquistes et très répandues dans l'environnement végétal, animal et humain. Les espèces en sont nombreuses et relativement difficiles à caractériser et identifier (Tailliez, 2004).

Les lactobacilles sont utilisés en industrie alimentaire en raison de leur capacité à inhiber et à réduire la contamination des produits alimentaires qui ont subi une détérioration par des microorganismes pathogènes, par la production des composés. (Da Silva Sabo et al., 2014).

Ce genre est partagé en trois groupes :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *L. helveticus*, *L. delbrueckii* et *L. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sakei* et *L. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires.

Il comporte les espèces *L. fermentum*, *L. brevis* et *L. sanfransisco*.

I.2.1.1. L'espèce *Lactobacillus rhamnosus* et les bienfaits: *L. rhamnosus* se distingue des autres espèces de lactobacilles par un métabolisme hétérofermentaire facultatif et une capacité à croître à des températures comprises entre 15°C et 45°C (Bergey et al., 1986). En effet, suite à la fermentation, *L. rhamnosus* est capable de produire de l'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique. De plus, cette espèce possède des NADH oxydases et des NADH peroxydases, lui permettant de survivre au stress oxydatif causé par la présence d'oxygène (Sakamoto et Komagata, 1996).

L. rhamnosus est l'une des souches probiotiques les plus étudiées pour ses propriétés fonctionnelles et elle est fréquemment utilisée pour le traitement d'infection du tractus gastro-intestinal (Surawicz, 2003).

De plus, il est reconnu que *L. rhamnosus* stimule la réponse immunitaire et réduit la diarrhée lors du traitement antibiotique, protège la barrière gastro-intestinale et peut prévenir les infections vaginales et le système urinaire (Reid et Burton, 2002 ; Sarawicz, 2003 ; MC Farland, 2006).

I.3. Critères de sélection des probiotiques

Afin de satisfaire la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets

positifs pour l'hôte. Or, toutes ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent être extrapolées à une autre souche de la même espèce(Izquierdo, 2009). Les micro-organismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères décrits dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Principaux critères de sélection des probiotiques(Saarelaetal.,2000).

Critères de sécurité	Identification taxonomique précise Origine humaine pour utilisation chez l'homme Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal
Critères fonctionnels	Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal Immun modulation Production de substances antimicrobienne(bactériocines, acides organique)
Critères technologiques	Conservation des propriétés probiotiques après production Non modification des propriétésorganoleptiques du produit fini Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini

L4.Mode d'action des probiotiques

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action des probiotiques. Ils sécrètent diverses substances antimicrobiennes telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. De plus, ils entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses. Les probiotiques peuvent également modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydoréduction, ce qui peut compromettre l'établissement de pathogènes. Enfin, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant le système immunitaire(Sanders,2008; Roy, 2011, Pascual etBarberis,2011;Reid, 2016).

I.4.1. Production des substances antimicrobiennes et inhibition des pathogènes

I.4.1.1. Les bactériocines :Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique, dont certains peuvent contenir des lipides ou de glucides associée, qui inhibent la croissance des espèces bactériennes et sont potentiellement utiles pour la prévention ou le traitement des maladies infectieuses bactériennes (Pascual et Barberis, 2011).

Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proche de la souche productrice. Les bactériocines des bactéries lactiques exercent leur activité létale en provoquant la lyse cellulaire, par la formation des pores au niveau de la membrane externe des bactéries (Dortu et al., 2009). Le mode d'action est illustré par la figure 1.

I.4.1.2. Le peroxyde d'hydrogène :La production de peroxyde d'hydrogène semble être une caractéristique de grande importance des lactobacilles vaginaux. Le peroxyde d'hydrogène est produit par certains lactobacilles en aérobiose. La toxicité du peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites $\text{OH}\cdot$ (radical hydroxyle) et O_2^- (anion superoxyde) produits par des agents réducteurs (ions halogénures du type Cl) et des enzymes peroxydases qui sont présentes dans le fluide vaginal (Pascual et Barberis, 2011).

I.4.1.3. Les biosurfactants :Les bactéries sont le principal groupe de micro-organismes produisant les bio surfactants, bien qu'elles soient également produites par des levures et des champignons filamenteux. En comparant avec des agents tensioactifs chimiques, ces composés présentent plusieurs avantages tels qu'une toxicité plus faible, biodégradabilité élevée, et leur efficacité à des températures extrêmes et des valeurs de pH (Gudena et al., 2011; Janek et al., 2013).

Les biosurfactants sont des polymères amphiphiles microbiens et des polymères polyphilic. Ils comprennent une large gamme de structures chimiques, telles que les glycolipides, les lipopeptides, les complexes de polysaccharide-protéine, des phospholipides, des acides gras et des lipides neutres. Ces molécules modifient l'hydrophobicité et donc inhiber l'adhésion des micro-organismes pathogènes sur le site d'infection (Pascual et Barberis, 2011).

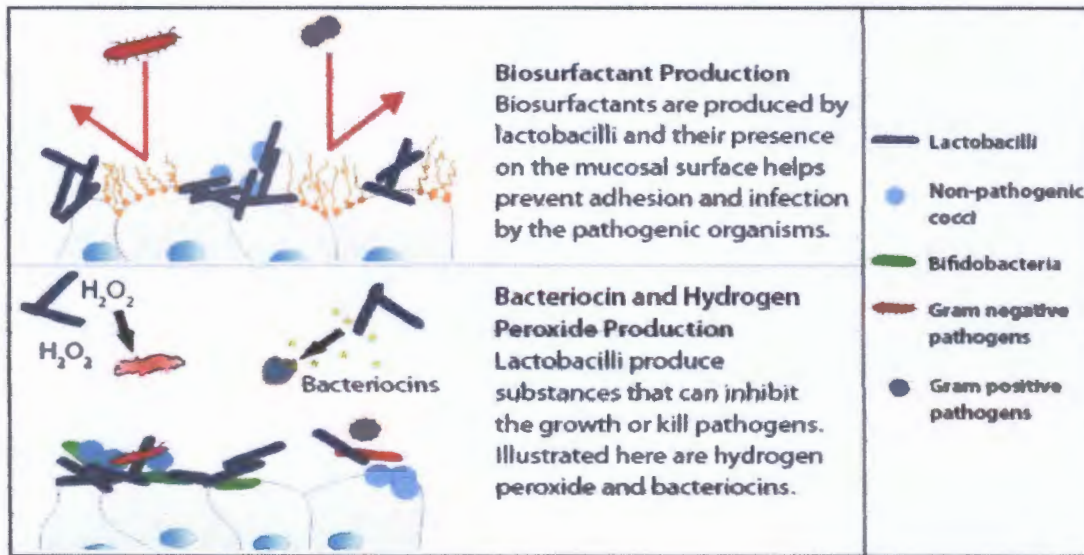


Figure 1 :Mode d'action des bactériocines et des biosurfactants(Engstrand *et al.*, 2012)

1.4.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène

L'adhésion des probiotiques à l'épithélium intestinal est au mucus et associée à la stimulation du système immunitaire, cette adhésion au muqueuse intestinale est également crucial pour la colonisation transitoire car elle représente une condition importante pour contrôler l'équilibre de la microflore intestinale. L'inhibition de l'adhésion du pathogène par les probiotiques peut fournir une protection significative de la santé humaine contre les infections par la formation d'une barrière naturelle contre les agents pathogènes exposés dans le tractus gastro-intestinale (Collado *et al.*, 2007).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques. Deux exemples de ces modes de compétition sont présentés sur la figure 2.

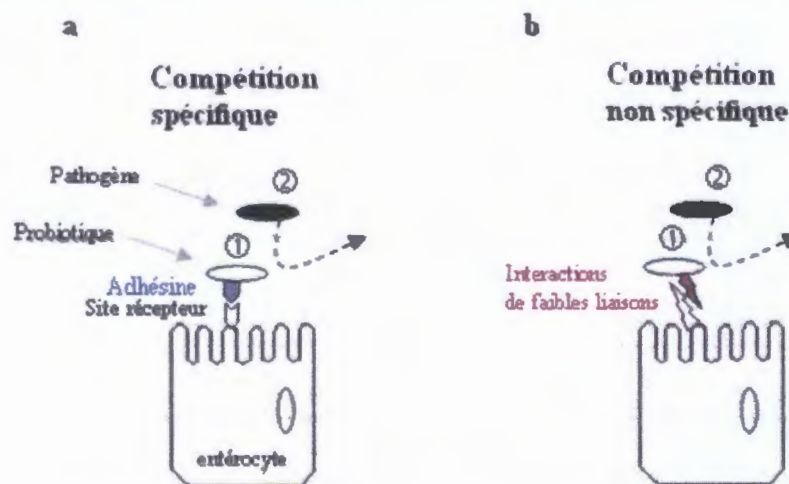


Figure 2. Mécanismes de compétition pour l'adhésion(Servinet Coconnier, 2003).

L'adhésion bactérienne est un critère d'intérêt lors de la sélection d'une souche probiotique. Ce phénomène est complexe et il dépend de plusieurs paramètres :

- **Les facteurs physicochimiques** : Sont généralement des facteurs environnementaux tels que la température, la concentration bactériennes, l'existence de flux, la qualité et la quantité des substances nutritives (Baillif *et al.*, 2010) ;
- **Le caractère hydrophile / hydrophobe de la surface bactériennes et l'auto / Coagréation** : L'hydrophobicité d'une bactérie varie suivant les espèces bactériennes et selon aussi les souches d'une même espèce, elle est influencée par le milieu environnant, l'âge de la bactérie ainsi que par sa structure. Les bactéries hydrophobes préfèrent des surfaces hydrophobe et les bactéries hydrophiles préfèrent des surfaces hydrophiles (Baillif *et al.*, 2010). L'auto-agrégation est un phénomène qui a une relation avec la capacité de l'adhérence de la bactérie, la floculation des bactéries sous forme d'agrégat, leur regroupement et leur accumulation sur une surface conduisent à la formation de dépôts connus sous le nom « biofilm », ce phénomène de la formation de ces agrégats est appelé l'auto-agrégation. L'auto-agrégation des souches probiotiques est apparue nécessaire pour l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin et la capacité à co-agréger avec d'autres bactéries, telles que les agents pathogènes et peuvent former une barrière qui empêche la colonisation par des micro-organismes pathogènes (Del Re *et al.*, 2000 ; Collado *et al.*, 2007)

Chapitre II: Les probiotiques dans les produits alimentaires

II.1. Les produits fermentés

Les produits fermentés sont le moyen de transport des probiotiques chez l'homme, qui ont plusieurs avantages, comme assurer le bon équilibre ou le bon fonctionnement de la flore intestinale, et le renforcement de la barrière intestinale. Des aspects technologiques doivent être considérés lors de la sélection des souches probiotiques, telles que la viabilité au cours du traitement, de la stabilité dans le produit au cours du stockage, de bonnes propriétés sensorielles et la résistance aux phages.

L'objectif le plus important des probiotiques est que les souches doivent être viables au moment de la consommation. Il a été suggéré que la concentration minimale de bactéries probiotiques vivantes à la date d'expiration du produit devrait être d'environ 10^7 ufc/ ml. De nombreuses études ont déjà indiqué l'impact de plusieurs facteurs sur la viabilité des probiotiques dans les produits fermentés, y compris le pH et l'acidité, la température de stockage, la nature des ingrédients ajoutés, les matrices alimentaires et la concentration des métabolites tels que l'acide lactique et les acides acétiques (Shori, 2016 ; Youssef *et al.*, 2016).

II.2. Les jus lacto-fermentés d'origine végétale :

La fermentation lactique des produits alimentaires est une de plus anciennes technologies connues. L'intérêt manifesté pour les produits végétaux obtenus par lactofermentation est basé sur des aspects nutritionnels, physiologiques et hygiéniques. Pour les jus qui s'obtiennent par fermentation lactique, le contenu en acide lactique est très important, car d'une part, il a un rôle décisif dans la préservation des produits finis et, d'autre part, il est impliqué dans la qualité sensorielle de jus (Greifová *et al.*, 2006).

Le jus de carotte a été choisi comme modèle pour la fermentation de légumes et comme un nouveau vecteur potentiel pour les probiotiques. La fermentation du jus de carotte diminue le niveau de sucres et l'acidification fournit un goût frais. Dans les légumes fermentés, la fermentation de l'acide lactique peut augmenter les niveaux de vitamines comme l'acide folique et cobalamine et d'améliorer la solubilité du fer dans le jus de carotte (Tamminen *et al.*, 2013).

II.3. Viabilité des bactéries probiotiques dans les produits alimentaires

Dans la littérature scientifique, des concentrations minimales de 10^6 et 10^7 UFC / g dans le produit fini sont considérées comme des quantités thérapeutiques de cultures probiotiques dans les aliments transformés (Talwalkar *et al.*, 2004), atteignant 10^8 et 10^9 UFC / g, fournies par une consommation quotidienne de 100 g ou 100 ml de lait fermenté, elle apporte un bénéfice pour la santé de l'homme (Jayamaneet Adams, 2006). Ces chiffres élevés ont été proposés pour compenser les pertes

possibles des microorganismes probiotiques pendant la durée de conservation de l'aliment probiotique, lors du transit dans les conditions acides de l'estomac, et de résister aux sels biliaires dans l'intestin grêle (Tamime, 2005).

La viabilité de bactéries probiotiques dépend des souches utilisées, l'interaction entre les espèces présentes, la production de peroxyde d'hydrogène par le métabolisme bactérien, les composants de la matrice alimentaire et l'acidité finale du produit (Farnworth, 2008).

II.4. Les principaux facteurs qui devraient être considérés dans le développement des probiotiques dans l'aliment

II.4.1. Les propriétés biologiques : Le premier point qui devrait être pris en considération est l'effet biologique désiré. Une haute viabilité et les taux de survie au cours du passage des probiotiques à travers l'estomac et dans l'intestin humain. Les fournisseurs de souches probiotiques ont toujours compté sur de nombreux tests *in vitro* sur leurs cultures pour sélectionner la souche la plus adaptée. La survie dans les conditions acides de l'estomac et de sels biliaires sont, par conséquent, une préoccupation majeure. Beaucoup d'autres propriétés ont été examinées *in vitro*, tels que sensibilité à l'oxygène, la stabilité au cours du stockage, de la résistance aux protéases du système digestif, et la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales (Jankovic *et al.*, 2010).

II.4.2. La sélection technologiques : Du point de vue du fournisseur, les qualités technologiques qui devraient posséder la souche sont le rendement de la biomasse à grande échelle et la facilité de concentration et de la survie durant la conservation et la congélation. Cependant, du point de vue du fabricant, d'autres qualités technologiques sont exigées, comme les variations de contraintes liées à la viabilité, les pertes en cours de traitement ou de stockage, il deviendra clair que la sélection des souches est cruciale dans le développement d'une souche probiotique.

Il convient également de souligner que, dans le processus de sélection de la souche, il est non seulement la souche est importante, mais également le procédé dans lequel elle est préparée est critique. De même, l'aspect de la technologie de fermentation, la technologie de séchage va influencer de manière significative les fonctionnalités des probiotiques (Jankovic *et al.*, 2010).

II.4.3. La sécurité: L'application de micro-organismes probiotiques dans les denrées alimentaires exige une évaluation approfondie de la sécurité. Plusieurs lignes directrices sont disponibles sur la façon d'évaluer l'innocuité des probiotiques utilisés dans les applications alimentaires. L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a mis au point une approche comme un outil pour l'évaluation la sécurité des micro-organismes utilisé dans les aliments. Ceci est basé sur une documentation. Les souches de *B. lactis* BB12, *L. rhamnosus* LGG, *L. reuteri* DSM 17938 ont été ces dernières années acceptées aux États-Unis pour des utilisations prévues (Jankovic *et al.*, 2010).

II.4.4. La stabilité pendant le stockage : Les consommateurs exigent de toute évidence que le produit qu'ils achètent contient des cultures probiotiques viables au moment de la consommation de l'aliment. Il est nécessaire d'examiner spécifiquement les facteurs qui affectent la survie pendant le stockage. L'effet biologique de la culture probiotique est généralement liée à la souche utilisée (Champagne *et al.*, 2005 ; Jankovic, 2010)

II.4.5. Le pH : La plupart des produits laitiers fermentés sont acide, le problème de la sensibilité à l'acidité des cultures probiotiques est aggravé par le fait que l'acidité peut augmenter au cours du stockage. Pour éviter cela, il semble important de sélectionner des lactobacilles qui ont de faibles sur-acidification c'est -à- dire d'utiliser des souches qui n'augmentent pas l'acidité du produit au cours du stockage (Jankovic, 2010)

II.4.6. L'oxygène : L'oxygène affecte les cultures probiotiques de deux manières, la première est due à une toxicité directe pour les cellules, certaines cultures probiotiques sont très sensibles à l'oxygène et meurent en sa présence, en raison de la production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène, la deuxième est due à l'effet indirecte de l'oxygène sur les cultures probiotiques, lorsque l'oxygène est dans le milieu, certaines cultures, excrètent le peroxyde dans le milieu. Ceci suggère que la souche probiotique peut donc être affectée par le H₂O₂ produit par d'autres cultures dans l'environnement (Jankovic, 2010)

De nombreuses études ont porté sur la prévention de l'effet néfaste de l'oxygène sur les cultures probiotiques, la plus courante est l'addition d'anti-oxydants, tels que l'acide ascorbique, ainsi que l'élimination des souches produisant du peroxyde car certaines souches probiotiques sont plus tolérantes à l'oxygène que d'autres (Champagne *et al.*, 2005).



**Etude
expérimentale**

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

L'intégralité de ce travail a été réalisée aux laboratoires de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril – Juin de l'année 2016.

II.1.1. Matériel biologique : Le matériel biologique utilisé est le suivant :

- ✓ **Les souches bactériennes :** il s'agit de deux souches de bactéries lactiques de genre *Lactobacillus*, *L.rhamnosus* S10, *L.satsumensis* S13 et de leur mixture elle ont proviennent de laboratoire de la faculté.
- ✓ **Lait écrémé :** la poudre de lait écrémé nous a été fourni par le responsable de la laiterie SKIPLAIT ;
- ✓ **Carottes et jus de carotte :** la carotte de variété Musca d'Alger a été achetée du marché de Jijel, la quantité étant de 5kg. Elle a servi pour la préparation du jus de carotte.

II.1.2. Les milieux de culture : La partie microbiologique de notre étude a nécessité les milieux de cultures suivants :

- ✓ **Gélose nutritive :** pour le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)
- ✓ **Gélose OGA (Oxytétracycline-Glucose-Agar) :** pour la recherche et dénombrement des levures et moisissures saprophytes ou pathogènes ;
- ✓ **Bouillon MRS :** pour la mise en culture des souches lactiques, ainsi que pour la réalisation des tests.

II.1.3. Produits chimiques et réactifs : L'ensemble de ce qui a été utilisé est le suivant :

- ✓ **Colorants :** Violet de Gentiane ; fuschine ; lugolet cristal violet ;
- ✓ **Produits chimiques :**
 - NaOH 1N, Phénolphaléine (pour la détermination d'acidité) ;
 - Xylène, toluène, chloroforme et l'éthyle acétate (pour le test d'hydrophobicité) ;
 - Empois d'amidon, di-iode (0.05mol/l) (pour la titration de la vitamine c) ;
 - Follin-Ciocalteu, carbonate de sodium (7.5 %) (pour la détermination de polyphenol) ;
 - Réactif de Tashiro, sulfate de cuivre, sulfate de potassium (pour le dosage de l'azote).
- ✓ **Tampons :**
 - Tampon PBS "tampon phosphate salin" pH=7.4, préparé au laboratoire pour lavage et conservation des cellules ;
 - Tampon phosphate urée sulfate magnésium pH=6.5, préparé au laboratoire pour le test d'hydrophobicité et l'auto/Co agrégation.

II.1.4. Appareillages : au cours de notre étude, on s'est servi du suivants :

- ✓ Appareil de Kjeldhel (Gerhardt) ;

- ✓ Autoclave (ShiavxElectronic) ;
- ✓ Bain Marie (Gerhardt Bonn, Memmert) ;
- ✓ Balance (KERN EMB 600-2) (ANDGULF) et balance analytique (Kernals 220.4N)
- ✓ Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- ✓ Etuves (Memmert) ;
- ✓ pH mètre (Hanna pH 211) (inola);
- ✓ Spectrophotomètre UV-Visible (Ultrospec 100 pro) (SHIMADZU) ;
- ✓ Vortex électrique (MS2 Minishaker, VWR VV3) ;
- ✓ Four à moufle (termolyne/furnace 6000) ;
- ✓ Agitateur magnétique (Stuart SB162) ;
- ✓ Réfrigérateur(Condor) ;
- ✓ Microscope à caméra (PARALUX) ;

II.2. Méthodes

II.2.1.Revivification des souches : Les souches ont été revivifiées par ensemencement dans le bouillon MRS suivis d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. La pureté de chaque souche a été vérifiée par plusieurs examen microscopique après coloration de Gram (**Idoui et al., 2009**).

II.2.2. Préparation des échantillons

II.2.2.1. Préparation de lait : Pour chaque échantillon, 9 g de lait en poudre a été pesé, ce dernier a été transféré dans des flacons stériles, puis le volume a été complété jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée stérile. Une fois le lait est préparé, nous avons appliqué le traitement thermique de pasteurisation. Après refroidissement chaque échantillon de lait a été ensemencé par la souche bactérienne correspondante et a été mis à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

II.2.2.2.Préparation de jus de carotte : 5 kg de carottes (variété Musca d'Alger) ont été bien lavés, nettoyés et épluchés, puis coupés en petits morceaux. À l'aide d'un bras mixeur, les carottes ont été broyées et mixées, le jus a été récupéré par filtration et a été mis dans des flacons stériles pour la tyndallisation(**Idoui, 2013**).

Après préparation du jus brut, nous avons confirmé l'absence de contaminants par une observation microscopique.

II.2.2.3 .Préparation de jus de carottelacto-fermenté : La méthode utilisée dans notre étude est celle décrite par **Idoui (2013)** avec quelques modifications. Chaque flacon de jus de carotte déjà préparé, a été ensemencé par le starter à raison de 5 %. La fermentation a été faite au bain Marie avec agitation à 37°C pendant 3h. La figure ci-dessous illustre les étapes de la préparation du jus de carottes lactofermenté.

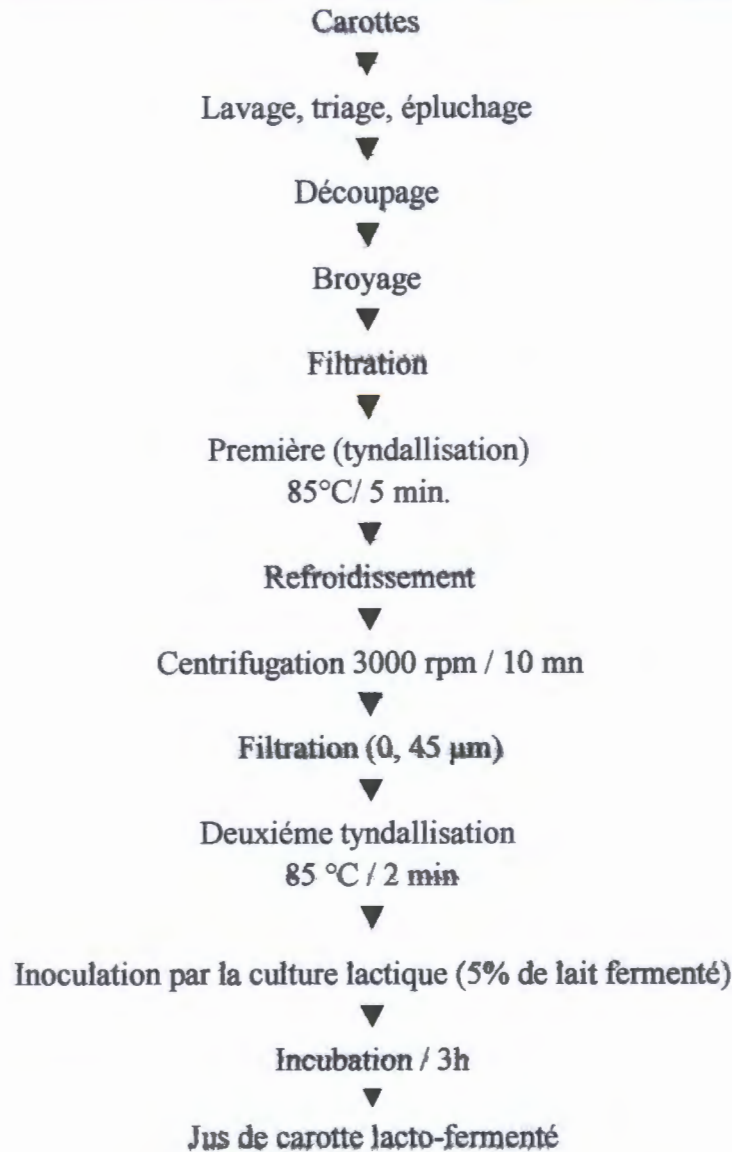


Figure 3. Schéma de la préparation du jus de carottes lacto-fermenté (Idoui, 2013)

II.2.3, Le contrôle du lait fermenté (starter): Les deux paramètres à contrôler sont l'acidité et le pH.

Pour l'acidité, un volume de 10 ml de lait a été transféré dans un bêcher dont l'acide lactique est titré par la soude dornic (0.1N) en présence de quelques gouttes de phénophtaléine (5 gouttes), la titration est arrêtée une fois avoir une couleur rose pâle persistante au moins 10 secondes (Luquet, 1985).



L'acidité est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Avec :

- V_{NaOH} : volume de la soude utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans 10ml de lait
- Pour le pH, la mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans un volume de 20 ml de l'échantillon (AOAC, 2000). La valeur de pH enregistrée sur l'écran de pH mètre a été notée.

II.2.4. Contrôle de jus de carottes lacto-fermenté : Nous avons procédé à un contrôle et un suivi de l'évolution de trois paramètres à savoir, le pH, l'acidité et le nombre de cellules :

- ✓ Au cours de la fermentation à T_{0h} (lors de l'ensemencement) et après chaque heure de fermentation (T_{1h} , T_{2h} et T_{3h}) ;
- ✓ Au cours du stockage réfrigéré à T_{3j} , après 6 jours et 9 jours (T_{6j} et T_{9j})

La détermination du pH et de l'acidité a été faite selon les mêmes protocoles déjà décrit pour le contrôle du lait fermenté (starter)

Pour le comptage des cellules bactériennes, la technique décrite par John et Alicia (2000) a été appliquée:

- ✓ **Préparation des micro-dilutions :** Le jus de carottes lacto-fermenté a été bien homogénéisé, à l'aide d'une micropipette des micro-dilutions ont été réalisées (100µl du produit dans 900µl de l'eau physiologique stérile).
- ✓ **Préparation de la cellule de Malassez :** il faut d'abord rincer la lame et la sécher à l'aide du papier absorbant. Pour réaliser le remplissage de la cellule, on a humidifié les glissières latérales puis, on a déposé la lamelle sur les rebords. Enfin, l'extrémité de la micropipette a été placée contre la lamelle et l'inoculum a été délivré par capillarité.
- ✓ **Observation microscopique et comptage des cellules:** la cellule est portée au microscope optique à l'objectif $\times 100$, les cellules vivantes sont comptées, et le nombre de cellules a été calculé selon la formule suivante :

$$N_c = N_g \cdot 100.1/Z$$

Avec :

- N_c : nombre de cellules ;
- N_g : nombre de cellules comptées sous microscope optique ;
- Z : la dilution utilisée.

II.5. Le contrôle des paramètres physico-chimique :

Afin d'avoir une idée sur quelques composants de notre matière première, le jus de carotte, ainsi que leur évolution dans le produit finis, nous avons évalué les paramètres suivants:

II.5.1. Dosage de la vitamine C (titrage direct): Un volume de 10 ml du jus de carottes a été titré par une solution de di-iodé à 0.05 mol/l en présence d'une pointe d'empois d'amidon. Le point final de la titration³ est identifié comme première trace permanente d'une couleur bleu-noire foncée due au complexe d'amidon-iodé (Belguedj, 2002)

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

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

Où :

T : Titre de la solution di-iodé (0,05 mol/l).

V : Volume d'iodé utilisé.

E : Prise d'essai (10 ml).

176 : Le poids moléculaire de l'acide ascorbique.

II.5.2. Détermination de la matière sèche (MS) : 10 g de chaque échantillon ont été pesés dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset a été ensuite mis à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le résultat est exprimé de la manière suivante (Lecoq, 1965):

$$\text{MS (\%)} = X/Y \times 100.$$

Avec :

MS : matière sèche ;

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

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

II.5.3. Détermination de la matière minérale : Pour la réalisation de cette manipulation, 10 g de chaque échantillon broyé ont été placés dans un creuset déjà séché et taré. Les creusets ont été placés dans le four à moufle à 550°C jusqu'à l'obtention de la couleur grise, couleur caractéristique des cendres. Le pourcentage de la matière minérale est calculé par la relation suivante (AOAC, 2000) :

$$MM (\%) = X/Y \times 100.$$

Avec :

MM : matière minérale ;

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

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

IL5.4. Dosage des sucres totaux : La technique utilisée est celle décrite par **Dubois et al. (1956)**.

Dans des tubes à essais propres, on met 2ml du jus de carotte; on ajoute 0.05 ml de phénol à 80% ; puis on ajoute rapidement 3ml d'acide sulfurique concentré 96% tout en évitant de verser de l'acide contre les parois du tube ; on obtient alors une solution, on passe au vortex pour homogénéiser la solution, puis on incube au bain-Marie à 30° C pendant

30 min. Par la suite, les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm. La concentration en sucres totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue, en utilisant le glucose comme solution standard d'étalonnage.

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

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

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)

IL5.5. détermination de la teneur en protéines (Kjeldahl, 1883) : Pour déterminer la quantité en protéines dans notre échantillon de jus de carottes, on procède à un dosage de l'azote total qui passe par les étapes suivantes

- ✓ **Minéralisation**: Dans un matras de l'appareil **Kjeldahl**, on introduit, 2 g du jus de carotte avec 2 g de catalyseur (Mélanger 20g de sulfate de cuivre, et sulfate de potassium), 25 ml de H₂SO₄ 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, à ce moment-là l'azote organique est transformé en azote minéral. Ensuite, on laisse refroidir et on transvase l'échantillon minéralisé dans une fiole, on lave le matras avec l'eau distillée tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.
- ✓ **Distillation** : 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 10 gouttes d'indicateur de Tashiro. La distillation est arrêtée au bout de 4 minutes à compter du début d'ébullition.

- ✓ **Titration** :Puisqu'on utilise 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'à changement de la coloration du vert au rose-violet dû au virage de l'indicateur de Tashiro. L'azote total est calculé suivant la formule représentée ci- dessous :

$$\text{Azote totale (N) (\%)} = \frac{(VB-VE).0,0014.10.100}{M}$$

Avec :

VB : Volume de NaOH 0,1 N utilisé pour un essai blanc (ml) ;

VE : Volume de NaOH 0,1N utilisé pour la titration de la solution à doser (ml) ;

100 : Coefficient du pourcentage ;

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

M : masse de la prise d'essai.

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

$$\text{Taux de protéines brutes (\%)} = \text{N total (\%)} \times 6,25$$

Avec : 6,25 est le facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

II.5.6. Dosage des polyphénols totaux :La teneur en phénols totaux qui se trouve dans le jus de carottes a été déterminée par la méthode de Singleton et Ross (1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Un volume de 200 µl du jus est introduit dans des tubes à essais, 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 est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm.

La quantité de polyphénols est calculée par référence à une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme standard.

II.6. Contrôle microbiologique

II.6.1. préparation des dilutions décimales:A l'aide d'une pipette stérile on prélève 1ml du jus de carottes fermenté et on l'introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on obtient alors la dilution 10^{-1} , à partir de cette dernière on refait la même opération pour aboutir à la dilution 10^{-6} .

II.6.2. Recherche et dénombrement des levures et moisissures : Le dénombrement est effectué sur le milieu OGA préalablement coulé et solidifié. 100 µl de la dilution 10^{-3} est étalé en surface du milieu et les boîtes sont incubées pendant 3 à 5 jours à une température de 25°C. Après incubation, nous avons dénombré toutes les colonies blanches sphériques et filamenteuses (Idoui, 2013).

II.6.3. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) : L'ensemencement est réalisé en étalant en double 100 µl de la dilution 10^{-6} en surface de la gélose nutritive préalablement coulée et solidifiée. L'incubation s'est effectuée à 37°C pendant 24h. Après cette durée, on dénombre les colonies lenticulaires (Guiraud et Rosec, 2004).

II.7. Evaluation des aptitudes probiotiques

Ces tests ont été réalisés sur le produit fini et après 3 jours, 6 jours et 9 jours de conservation. Les résultats des tests qui vont être décrits, nous laissent avoir une idée sur l'effet de la fermentation et de la conservation sur les aptitudes probiotiques des souches mises aux tests, c.à.d. s'il y a une perte de ces propriétés ou non. Les mêmes techniques utilisées par Kiaset Kriket (2015) ont été utilisées et ce afin d'avoir une reproductibilité des résultats :

II.7.1. Test d'hydrophobicité : L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par Iyer *et al.* (2010) : Un volume de jus de carottes lacto-fermenté est centrifugé à 12000 rpm/15min, le culot est récupéré et incubé avec du bouillon MRS à 37°C/18h. Après une centrifugation de 12000 rpm/5min suivie de deux lavages successifs avec du PBS, le culot bactérien a été récupéré puis resuspendu dans 1.2 ml de tamponurée phosphate magnésium (pH 6.5). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1.0 à 450nm (DO initiale). Par la suite 0.6 ml du solvant (xylène, toluène, chloroforme ; éthylacétate) a été ajouté doucement à chaque 3 ml de la suspension bactérienne, puis incubée à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2min puis laissé au repos. Après précipitation, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale. La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculée par l'équation suivante:

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \left[\frac{DO_{\text{initial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{initial}}} \right] \times 100$$

II.7.2. Adhésion in vitro au tissu épithélial : Ce test est basé sur l'étude de la capacité des souches à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal. Pour le réaliser, la méthode décrite par Lin *et al.* (2007) qui comporte trois étapes, a été impliquée:

- ✓ **Préparation des cellules épithéliales:** Pour la préparation des cellules épithéliales, un segment de l'iléum d'un poulet de chair a été bien lavé et nettoyé puis ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), après une tenue dans le PBS à 4°C pendant 30 min. Par la suite, les tissus ont été repris, lavés 10 fois avec du PBS stérile puis laissés au repos à 4°C pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant ce segment intestinal par une lame stérile et elles sont par la suite récupérées dans un tube à essai stérile contenant le tampon PBS. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5×10^4 cellules/ml.
- ✓ **Préparation des cellules bactériennes:** Un volume de jus de carottes lacto-fermenté a été récupéré dans des tubes à hémolyse puis centrifugé à 6000 rpm/10min, le culot par la suite est incubé dans le bouillon MRS pendant 18h. Les cellules bactériennes jeunes ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm/10min suivi de deux lavages successifs avec du PBS puis chaque culot reçoit 2 ml du PBS. Une observation microscopique (Gx100) a été faite pour pouvoir standardiser l'inoculum à 10^8 cellules/ml.
- ✓ **Réalisation du test :** 1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, 1h, 2h et 3h, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.

II.7.3. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation : On a appliqué la technique décrite par Tomás *et al.* (2005). Un volume de jus de carottes lacto-fermenté a été centrifugé à 6000 rpm/10min, le culot obtenu est incubé dans le bouillon MRS pendant 18h. Une deuxième centrifugation a été faite à 6000 rpm/10min, le culot est lavé deux fois avec du PBS (pH= 7,2). Le nombre de cellules viables a été ajusté à 10^8 UFC/ml ($DO_{600} = 0,6$).

La suspension des cultures standardisées (4ml) a été homogénéisée par un vortex et l'auto-agrégation a été déterminée durant les temps d'incubation 0h, 1h, 2h et 3h à la température ambiante. Le pourcentage (%) d'auto-agrégation est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'auto-agrégation} = \left[\frac{DO_{\text{initial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{initial}}} \right] \times 100$$

La même méthode a été appliquée pour la mixture pour calculer le % de la Co-agrégation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de co-aggregation} = \frac{(DO_1 + DO_2) - 2(DO_3)}{(DO_1 + DO_2)} \times 100$$

Avec :

DO₁ : la densité optique de la souche 1 ;

DO₂ : la densité optique de la souche 2 ;

DO₃ : la densité optique de la mixture.

A decorative border in a light orange color frames the page, styled like a scroll. It has rounded corners and two blue, teardrop-shaped accents at the top-left and bottom-left corners, suggesting the scroll is unrolled.

Résultats et Discussion

III.1. Evolution du pH et de l'acidité des cultures starters

L'évolution du pH et de l'acidité des trois cultures starters est groupée dans le **tableau 3**. Les résultats de mesure du pH montrent que le lait après ensemencement possède un pH acide. Les valeurs ont été situées entre pH 4.07 et pH 4.09.

Tableau 3 : Résultats du pH et de l'acidité des cultures starters

souches	<i>L.rhamnosus</i> S10	<i>L.satsumensis</i> S13	Starter Mixte
pH	4.08	4.07	4.09
Acidité (°D)	30	35	40

Quant à l'acidité, nous avons remarqué une augmentation progressive après 24h d'incubation. L'augmentation de l'acidité couplée à la diminution du pH s'explique par l'activité métabolique des starters utilisés, cette activité se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de leurs croissances (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008).

III.2. Evolution du pH et l'acidité au cours de la fermentation du jus de carottes et après conservation

La valeur du pH du jus de carottes avant la fermentation est de 6,13. Les résultats de l'étude menée sur le même produit par Tamminen *et al.* (2013), ont montré un pH de 6,7 du jus avant la fermentation, par ailleurs, Kunen *et al.* (2008), ont trouvé un pH de 6,4 pour le même produit avant fermentation.

Cependant, après ensemencement du jus de carottes brut par les cultures starters, nous constatons une diminution progressive des valeurs du pH au cours du temps de fermentation. La figure ci-dessous, représente l'évolution du pH dans les échantillons au cours de la fermentation.

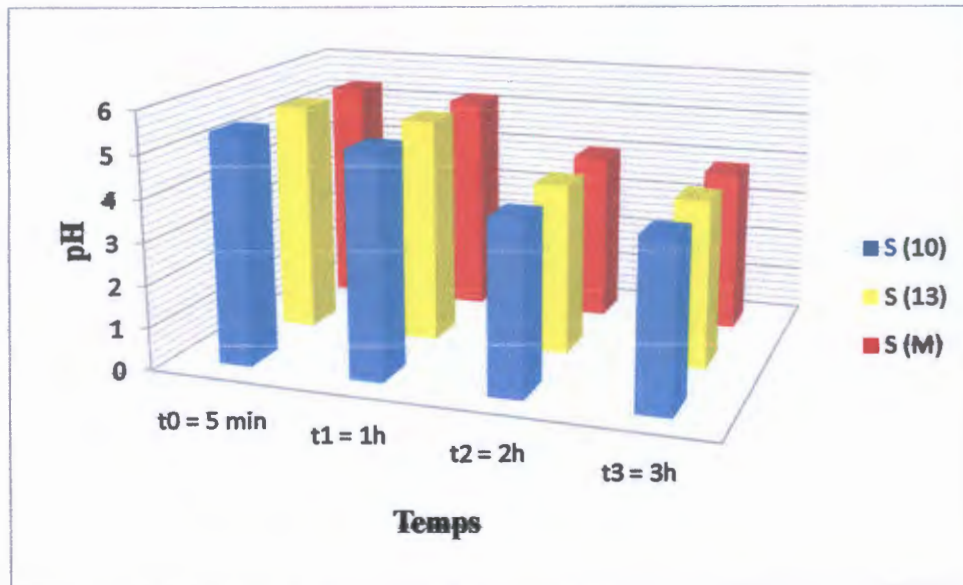


Figure 4: Valeurs du pH des échantillons de jus de carottes au cours de fermentation.

Après ensemencement des échantillons de jus de carottes par la souche *L. rhamnosus* S(10) et la souche *L. satsumensis* S(13), le pH s'est situé entre 5,41 et 5,44 respectivement, mais après trois heures de fermentation, on constate que le pH diminue et se stabilise au alentour de 3,9.

Pour le jus de carottes ensemencé par la culture mixture le pH, au début de la fermentation était de 5,35, et après trois heures de fermentation il a chuté à une valeur de 3,84. Il apparait clairement que la culture mixte est plus performante et produit plus d'acide lactique ce qui conduit à un abaissement de pH à cette valeur après 3h de fermentation.

Les résultats de l'étude menée par Tamminen *et al.* (2013), et celle menée par Demiret *et al.* (2006) sur la fermentation du jus de carottes par usage de différentes souches de lactobacilles ont montré que le processus de la fermentation ramène le jus de carottes à des pH de 3,8 et 3,9 respectivement, ce qui corrobore et les valeurs trouvées dans notre étude.

Par ailleurs, Nazzaro *et al.* (2008), ont trouvé que la fermentation du jus de carottes par la souche de *L. rhamnosus* a conduit à l'obtention d'un pH final 3,58 après 48h d'incubation.

Après la conservation de ces échantillons dans le réfrigérateur à 4°C, on a procédé au suivi de l'évolution du pH après 3jours, 6jours et 9jours de conservation et les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 5.

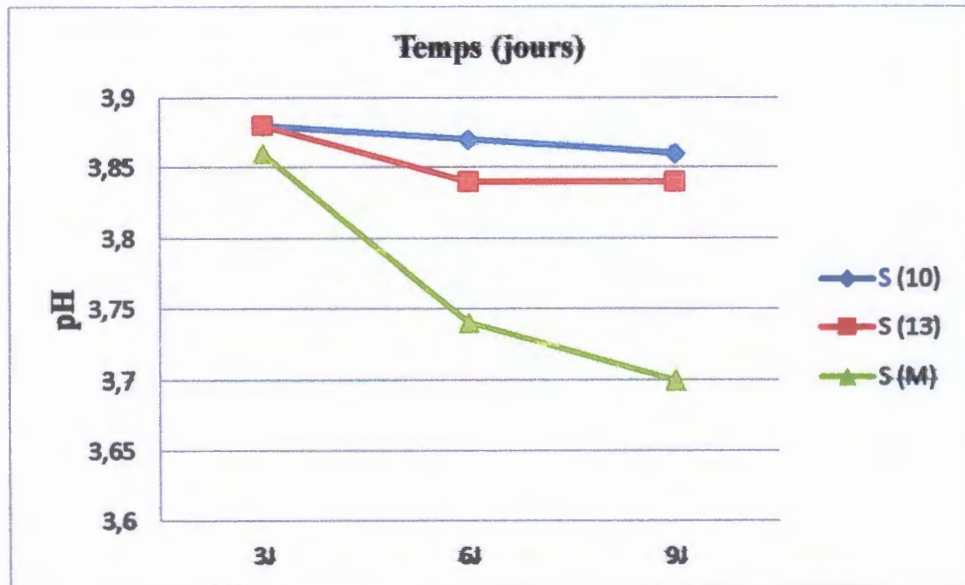


Figure 5 : Valeurs du pH au cours de la conservation.

D'après ces résultats, on constate une diminution progressive du pH au cours de la conservation. Pour les échantillons à culture S10 et S13, le pH se stabilise au alentour de 3,8 après les six jours de conservation, cependant, le jus de carotte à culture mixte montre un le pH le plus bas (3,7) après la même période de conservation. Ces résultats, s'explique par une activité métabolique des cultures même sous régime du froid.

L'étude menée par Daneshiet *al.* (2013), sur l'effet de la réfrigération (4°C) sur la viabilité du probiotique *L. rhamnosus* dans le jus de carottes lactofermenté a montré qu'après 20 jours de stockage, le pH chute de 6,6 à 5,3. Par comparaison à ces résultats, nous constatons que notre S10 de *L. rhamnosus* a une activité fermentaire plus prononcée même sous régime du froid.

Les résultats de l'acidité du jus de carottes au cours de la fermentation sont illustrés par la figure 6. Ces résultats montrent qu'il y a une stabilité de l'acidité après une heure de fermentation dont les valeurs sont comparables à celles obtenues au moment de l'ensemencement des échantillons du jus de carottes par les cultures. Cependant, l'activité métabolique des cultures apparaît après les 3h d'incubation dont l'acidité atteint 30°D, 33°D et 31°D respectivement pour le jus de carottes à *L. rhamnosus* S(10), celui à *L. satsumensis* (S13) et celui fermenté avec la mixture.

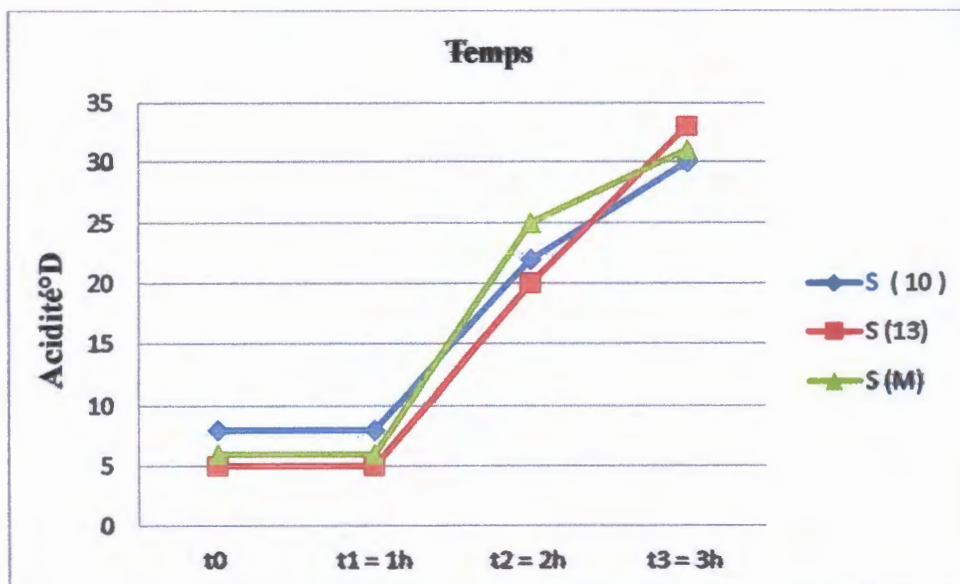


Figure 6 : Evolution de l'acidité au cours de la fermentation

Pour le même paramètre et au cours de la conservation, nous constatons que le froid n'affecte pas le métabolisme fermentaire des souches, les valeurs illustrées par la figure 07 témoignent une production d'acide lactique dans le produit.

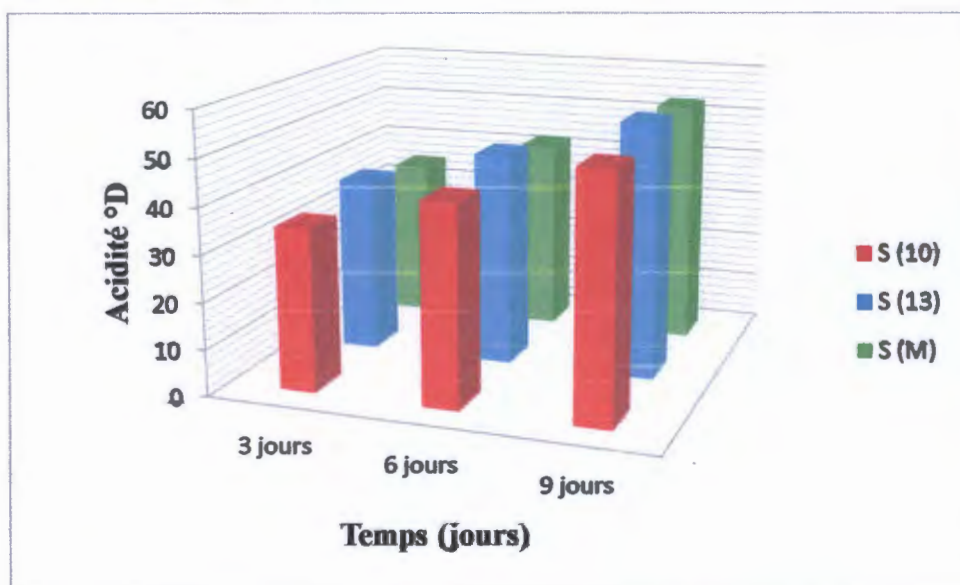


Figure 7: Evolution de l'acidité au cours de la conservation.

III. 3. Evaluation du nombre de cellules au cours de fermentation, du produit fini et après conservation :

Au cours de la fermentation du jus, le nombre de cellules viable est calculé en utilisant la cellule de Mallasez. Les résultats sont illustrés par la figure 8.

On remarque qu'il y a une augmentation du nombre de cellules au cours de la fermentation, pour le jus ensemencé par *L. rhamnosus* S(10) le nombre de cellules a atteint 22×10^{12} cellules/ml, il est presque le même pour le jus ensemencé par *L. satsumensis* S(13) qui était de l'ordre de $21,33 \times 10^{12}$ cellules/ml, et pour le jus ensemencé par le starter mixte, le nombre est beaucoup plus élevé que celui trouvé dans les jus de carottes ensemencés par les cultures pures, ce dernier était de l'ordre de $23,66 \times 10^{12}$ cellules/ml.

Après la conservation du jus, on a compté de la même manière le nombre de cellules après 3 jours, 6 jours et 9 jours de conservation, les résultats sont illustrés dans la figure 9.

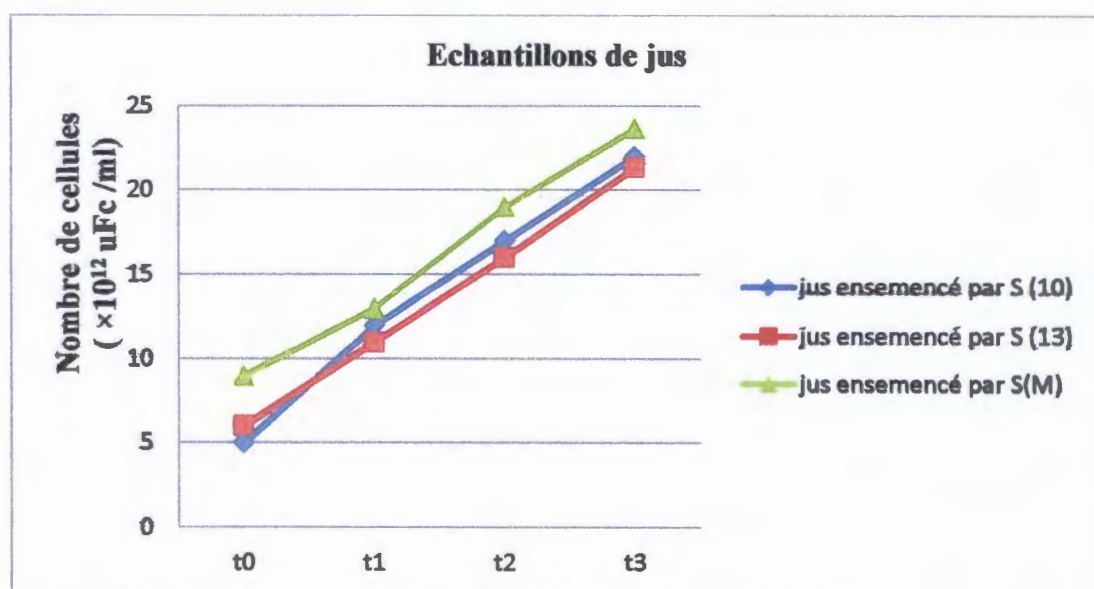


Figure 8 : Evolution du nombre de cellules bactériennes au cours de la fermentation

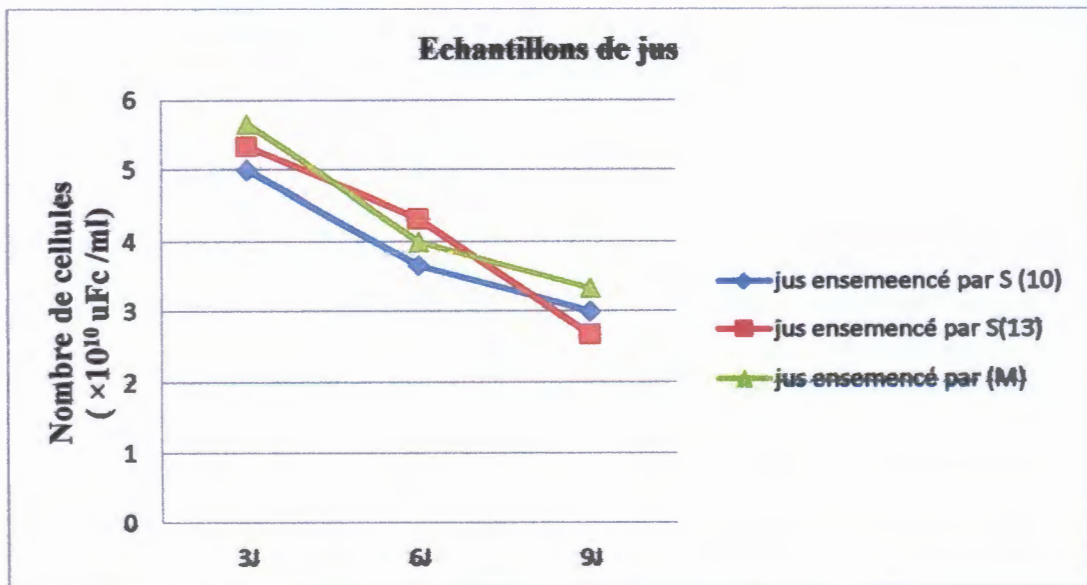


Figure 9 : Evolution du nombre de cellules bactériennes au cours de la conservation.

Les résultats de la figure 9 montrent que le nombre de cellules diminue d'une manière progressive au cours des jours de stockage, après 9 jours de conservation le nombre de cellules pour les trois échantillons est dans l'intervalle de 2,66 à $3.33 \times 10^{10}/\text{ml}$.

Dans l'étude de Daneshi et al. (2013), le nombre de cellules dans le jus de carottes fermenté par *L. rhamnosus* a diminué durant les 20 jours de conservation pour atteindre le nombre de 6.08 [log ufc ml⁻¹].

Le jus de carotte à base de cèleri et les pommes a montré une bonne matrice pour la croissance de *L. acidophilus*, d'autre part le jus de carotte seul est une base appropriée pour les *Bifidobacterium lactis* et des souches de *B. bifidum*, et lorsque *L. rhamnosus* est ajoutée au jus de carotte, il y a eu une bonne viabilité (Nazzaro et al., 2008 ; Do Espirito Santo et al., 2011).

III .4. Contrôle des paramètres physico-chimique

Ce contrôle a pour objectifs, la détermination de la composition de la matière première, ce qui nous permettra d'avoir une idée sur les composants qui peuvent affecter la croissance des cultures et même temps ceux qui agissent en faveur de la fermentation.

III.4.1. Teneur en vitamine C :

Puisque l'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, il est présent avec des quantités excessives dans les fruits et les légumes. Les résultats de dosage de la vitamine C sont illustrés dans la figure 10.

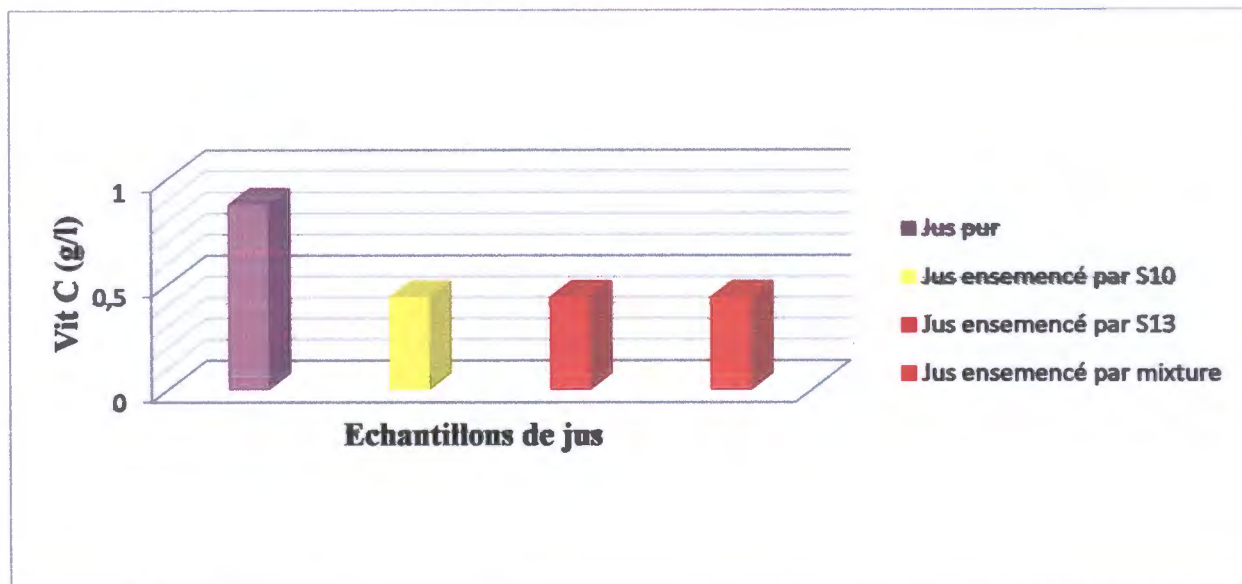


Figure 10: Teneurs en acide ascorbiques des échantillons de jus.

Ces résultats montrent que la teneur en vitamine C de jus de carotte est de 0.88 g/l. Après la fermentation, une perte jusqu'à 50% a été remarquée pour les trois échantillons, elle est de l'ordre de 0.44 g/l. Pour un jus de carottes pur, la teneur en vitamine C est comprise entre 6mg/100 g et entre 8.5 mg/100 g comme valeur maximale (anonyme 2013). Cette perte en vitamine C est liée à l'effet de la stérilisation de notre jus, cela se confirme par ce qui a été rapporté par Alwazer et al. (2003) qui a montré que le simple fait de blanchir une minute un légume entraîne déjà une perte de 35% de sa vitamine C. De même, Southgate et Johnson (1993) ont rapporté que la vitamine C est sensible à la chaleur et son taux dans le produit peut diminuer d'une façon très importante lors du traitement de pasteurisation, à partir d'une température de 70 degrés, la vitamine C est détruite.

III.4.2. Teneur en matière sèche et en cendres

La figure 11 représente les résultats de la matière sèche de jus de carotte pur et produit fini, où on constate que la teneur en matière sèche de ce dernier augmente par rapport à celle de la matière première. Cependant, le jusensemencé par la culture mixte montre une teneur maximale 7.7 %.

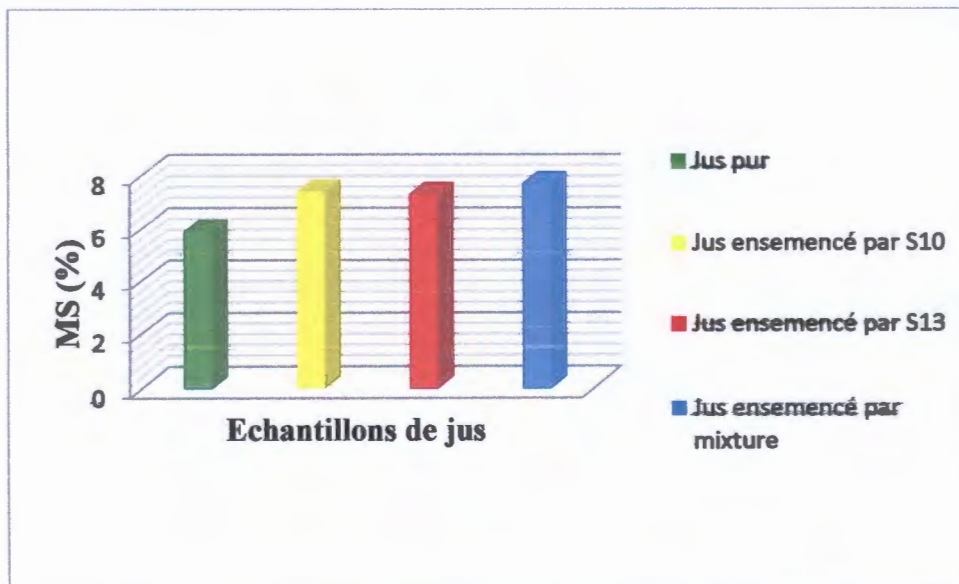


Figure 11: Teneur en matière sèche des trois échantillons.

La figure 12, illustre les résultats obtenus pour la teneur en cendres de jus pur et produit fini dont on remarque que la teneur en matière minérale ne change pas, elle est de l'ordre de 0.7% pour le jus de carotte pur et elle oscille entre 0.5 et 0.8 % pour les jus lacto-fermentés. Nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés par Sharma *et al.* (2012) qui ont trouvé dans le produit analogue (jus de carottes), une teneur en cendres de l'ordre de 1,1%.

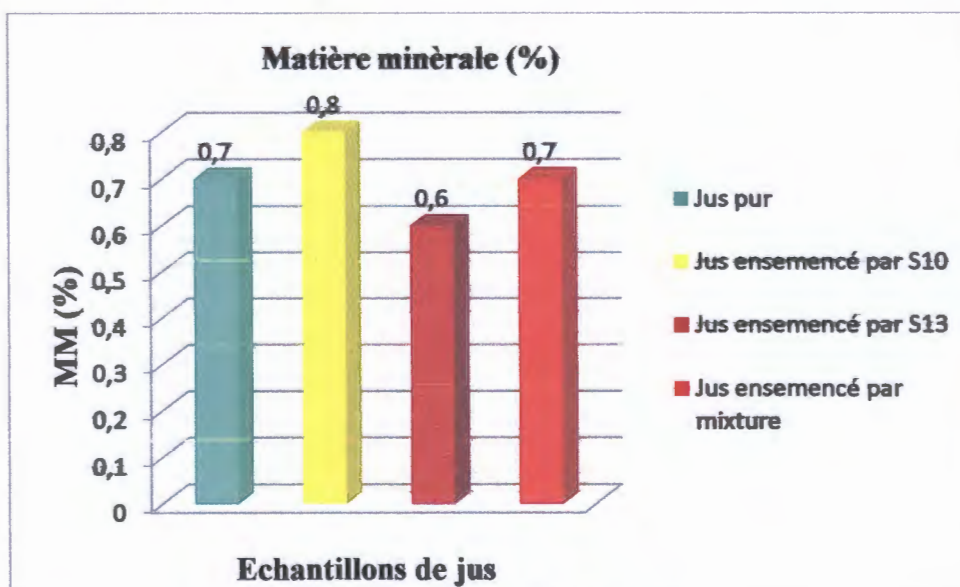


Figure 12 : Teneur en cendres

III.4.3. Teneur en sucres totaux

Les sucres sont des constituants importants de la carotte; ils sont responsables de la douceur de l'aliment. La teneur en sucre est calculée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de glucose (annexe 5) et après par la formule qui permet de calculer le pourcentage % de la teneur en sucres totaux dans les échantillons. Les résultats de la teneur en sucres totaux de chaque échantillon de jus de carotte sont illustrés dans la figure 13. D'après ces résultats, il y a une variabilité de la teneur en ces composés dont le jus frais contient la plus forte teneur.

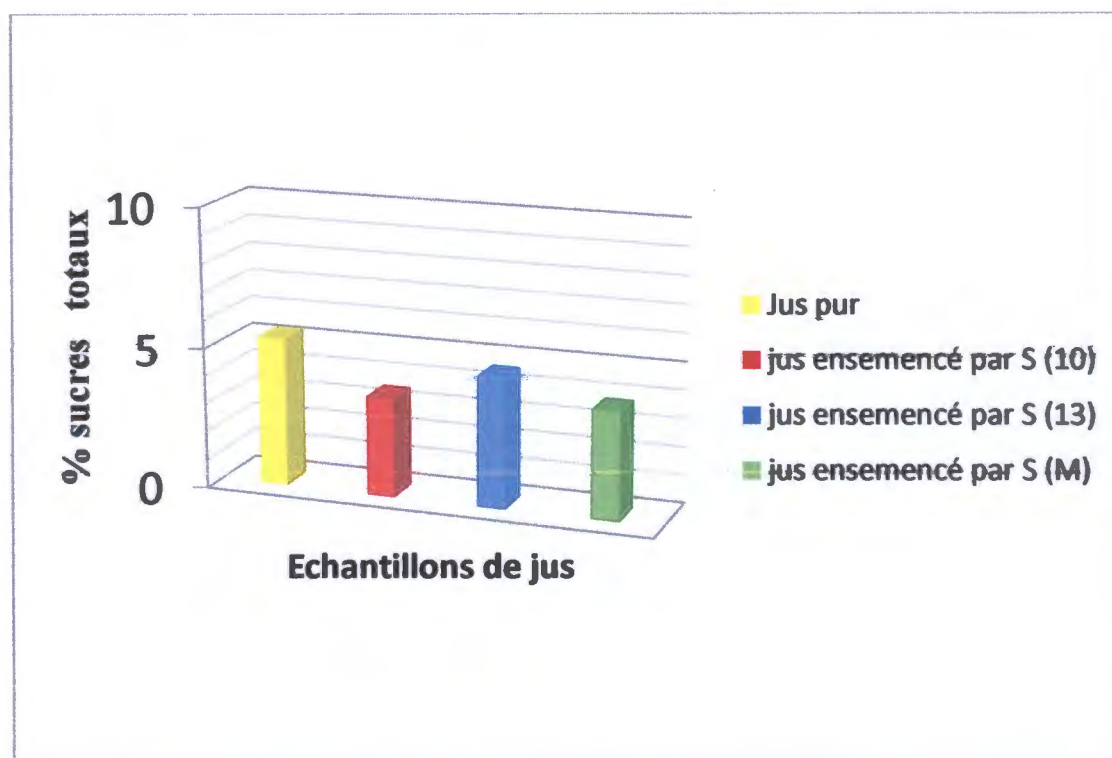


Figure 13 :Teneurs en sucres totaux des échantillons de jus.

L'étude menée par Sharma *et al.* (2012), sur la composition chimique des carottes a montré que la teneur en sucre totaux était de 5,6%, cette valeur est proche de celle trouvée avec les carottes de variété Musca d'Alger. La faible différence constatée, peut être liée au type de carotte et les conditions de cultures.

Par ailleurs et par comparaison de la teneur en sucre de notre jus à celle de la (anonyme 2013) du jus de carottes pur (5,09%), on trouve qu'elle coïncide à la valeur donnée.

Passant au jus fermenté par les souches, on a trouvé des valeurs qui varient entre 3,5 et 4,6%, ces valeurs sont comparables à celles trouvées par Kunet *al.* (2008) ayant utilisé des souches de *Bifidobacterium* pour la fermentation du jus de carottes, les teneurs étaient entre 4,36 et 4,12 % après 6h de fermentation. De même, les résultats de l'étude menée par Demirel *et al.* (2006) sur l'effet

de la concentration des souches de lactobacilles sur les propriétés du jus de carottes fermenté ont montré que la teneur en sucre était de 4,93g/100ml de jus de carottes fermenté.

III.4.4. Teneur en azote totale et en protéines

Selon(anonyme 2013) la teneur en protéines de jus de carotte pur est de l'ordre de 0,817g/100g comme une valeur moyenne et de 1 g/100g comme une valeur maximale. La figure14, donne le taux de protéines brutes ainsi que la teneur en azote total des échantillons de jus de carottes brut et fermenté.

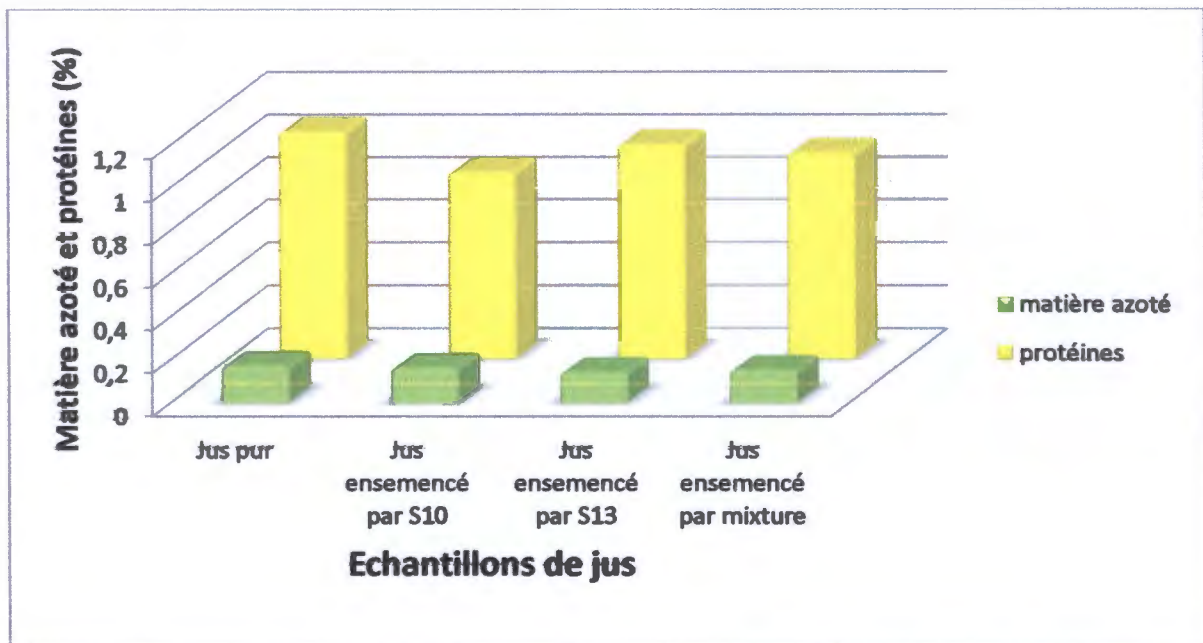


Figure 14: Teneurs en azote total et en protéines brutes dans les échantillons de jus.

La lecture de la figure 14 montre que le taux de protéines brutes est compris entre 1,06 et 0,96 %, d'où la valeur maximale est enregistrée avec le jus pur (1,06%), suivi par l'échantillon de jusensemencé par *L.satsumensis* S(13) qui renferme une teneur de 1% , puis par celle du jusensemencé par la mixture des deux souches (0,96%),et la plus faible teneur trouvée est celle du jusensemencé par *L. rhamnosus* S(10). On peut dire d'après ces résultats que la fermentation du jus de carotte n'a pas un impact sur la teneur en protéines.

Les résultats de l'étude menée par Sharma et al.(2012),sur un produit analogue, ont montré que la teneur en protéines était de 0,7%.Nos résultats relatifs à ce paramètre sont dans la fourche des valeurs de (anonyme 2013)et corroborent à ceux del'étude de Sharma et al.(2012).

III.4.5. Teneur en polyphénols totaux

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage(annexe5) exprimé mg équivalent d'acide gallique/100ml. Les résultats illustrés par la figure 15, montrent que les quatre échantillons présentent des teneurs variables en polyphénols totaux.

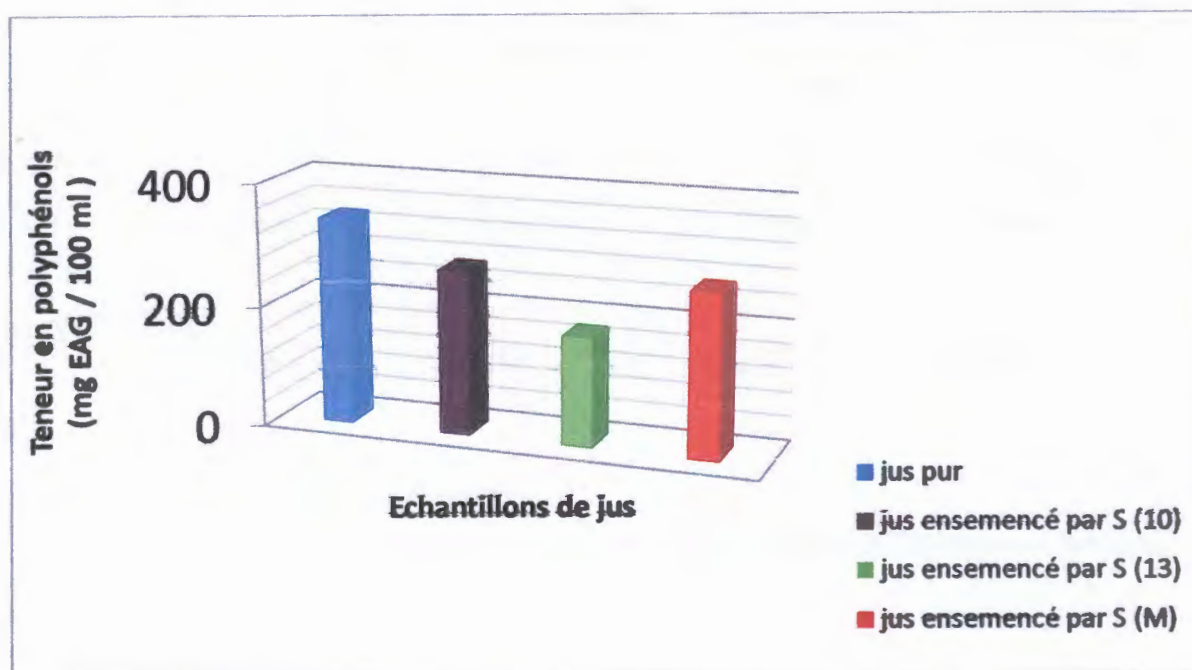


Figure 15 :Teneurs en polyphénolsdes échantillons de jus

Le jus de carottes pur possède la teneur la plus élevée en polyphénols totaux, de l'ordre de 339 mg EAG/100ml, suivie par le jus ensemencé par la souche *L.rhamnosus* S10, *L.satsumensis* S(13) et leur mixture, avec des teneurs de 270 mg EAG/100ml ,269 mg EAG/100ml et 180 mg EAG/100ml respectivement. Nos résultats vont et ceux trouvés par Leahuet *al.*(2013) qui ont trouvé une teneur de 325.2 ± 5.17 mg EAG/100ml dans le jus de carottes frais. Cependant, il apparait qu'il y a une perte de ces composés dans le jus de carottes lactofermenté.

III.5. Contrôle microbiologique des jus de carottes

La recherche de microorganismes indicateurs de contaminations permet de juger l'état hygiénique d'un produit. La FTAM est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits, ainsi le nombre des germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de la qualité sanitaire du produit (Guiraud, 1998). Nos résultats montrent qu'il y a une absence totale de cette flore dans les échantillons analysés. Cela peut s'expliquer par l'efficacité de la stérilisation. Cependant, ce qui est contradictoire est la présence de levures avec un nombre qui varie entre 10^3 et 3.10^3 . Il est possible que ce soit un contaminant de l'environnement de laboratoire et non pas de notre produit car, tous les étudiants qui travaillent sur les différents sujets se sont heurtés aux mêmes problèmes.

Tableau 4: Résultats du contrôle microbiologique

Souche	Jus ensemencé par la souche (S10)	Jus ensemencé par la souche (S13)	Jus ensemencé par la mixture (SM)	Jus de carotte (matière première)
Flora aérobie mésophile totale (UFC/ml)	Absence	Absence	Absence	Absence
moisissure (UFC/ml)	Absence	Absence	Absence	Absence
Levures (UFC/ml)	2.10^3	9.10^3	3.10^3	4.10^3

III.6. Evaluation des aptitudes probiotique

Cette partie a été entreprise, pour évaluer l'effet matrice alimentaire-conservation sur les trois aptitudes probiotiques des souches.

III.6.1. Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence (Roos et Jonsson, 2002 ; Guglielmotti et al., 2007).

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité des souches *L. rhamnosus* S(10) et *L. satsumensis* S(13) vis-à-vis du chloroforme, éthyle acétate, toluène et xylène qui peut refléter le potentiel de d'adhésion des souches probiotiques et leur colonisation intestinal. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le chloroforme, xylène, éthyleacétate et toluène résulte de l'interaction hydrophobe entre les composant des parois de la bactérie et les solvants. Les résultats de ce test sont illustrés par la figure 16.

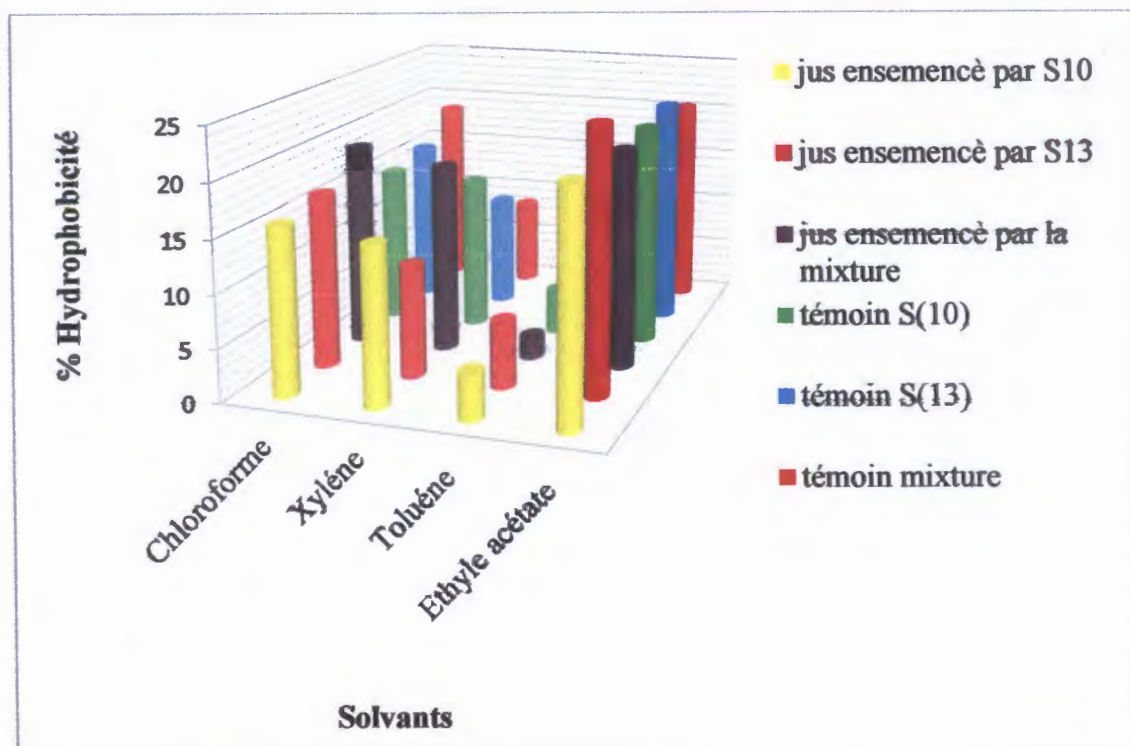


Figure 16 :Pourcentages d'hydrophobicité des souches produit fini avec le témoin.

Selon les résultats exprimés en %, on classe l'hydrophobicité comme faible (0-35%), modérée (36-70%) ou forte (71-100%) (Ekmelci *et al.* 2009). Avec le toluène le pourcentage le plus faible a été enregistré avec les cultures récupérées des produits finis fermentés par *L. rhamnosus* S(10), *L. satsumensis* S(13) et leur mixture respectivement, le pourcentage était de 4,35%, 6,30 et 2,11%. Cependant, il y a une amélioration de cette aptitude probiotique avec le xylène, ou les pourcentages respectifs étaient de l'ordre de 14,94%, 10,71%, et 8,11%. L'affinité de S(10) et S(13) et la mixture au xylène est plus élevée que celle obtenue avec le toluène, on déduit que les deux souches ont une paroi hydrophile.

Les deux souches ont montré une adhérence élevée avec l'éthyleacétate par rapport au chloroforme ; dont les pourcentages obtenus avec le chloroforme et l'éthyle acétate étaient de 15,89%, 16,65%, 19,32% et 21,65%, 24,87%, 20,82% pour *L. rhamnosus* S(10), *L. satsumensis* S(13) et leurs mixture respectivement. La forte affinité à l'éthyleacétate montre que les souches sont des forts accepteurs d'électrons.

L'étude menée par d'Abdulla *et al.* (2014), sur l'hydrophobicité de six souches de lactobacilles a montré que le pourcentage d'hydrophobicité vis-à-vis du xylène varie entre 30% et 80%, et au chloroforme entre 48% et 79%. D'après les résultats des travaux de Guglielmotti *et al.* (2007), des espèces de *Lactobacillus* ont révélé une hydrophobicité vis-à-vis du xylène qui varie entre 5% et

III. Résultats et Discussion

63%. Par ailleurs, dans une autre étude réalisée par **Panet *al.*(2006)**, l'hydrophobicité de vingt trois souches de *Bifidobacterium* était comprise entre 32% et 37%. Par ailleurs, **Vinderola et Reinheimer(2003)** ont trouvé que l'hydrophobicité de *L. rhamnosus* était de 24,1%.

Après tout ce qui a été dit, il semble que nos résultats corroborent et ceux des travaux de certains auteurs, en revanche, ils sont loin de ceux trouvés par d'autres auteurs.

Cependant, **Shikirova *et al.*(2013)** ont montré que les bactéries gram+ possèdent un pourcentage d'hydrophobicité élevé par rapport à des gram-, par ailleurs, une étude menée sur la chimie de la surface bactérienne a montré que la présence du matériel protéique sur la surface reflète une forte hydrophobicité tandis que des surfaces hydrophiles sont associées à la présence des polysaccharides (**Collado *et al.*, 2008**).

Cependant, la comparaison de nos résultats avec notre témoin, montre la présence de nos souches dans une matrice alimentaire, dans cette étude, le jus de carottes lactofermenté n'altère en aucun cas cette propriété probiotique.

Après une semaine et deux semaines de conservation, cette aptitude probiotique a été évaluée et les figures 17,18 illustrent les résultats obtenus. On remarque qu'il y a un effet modéré de la conservation à 4°C sur l'hydrophobicité, donc les souches gardent le même potentiel.

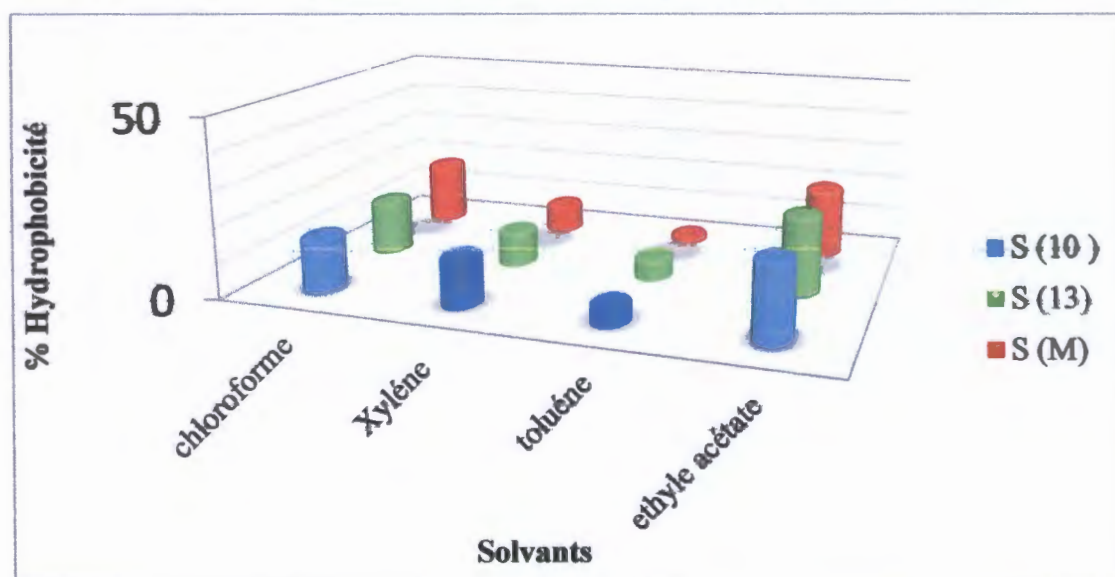


Figure 17 : Pourcentages d'hydrophobicité après une semaine de conservation du produit

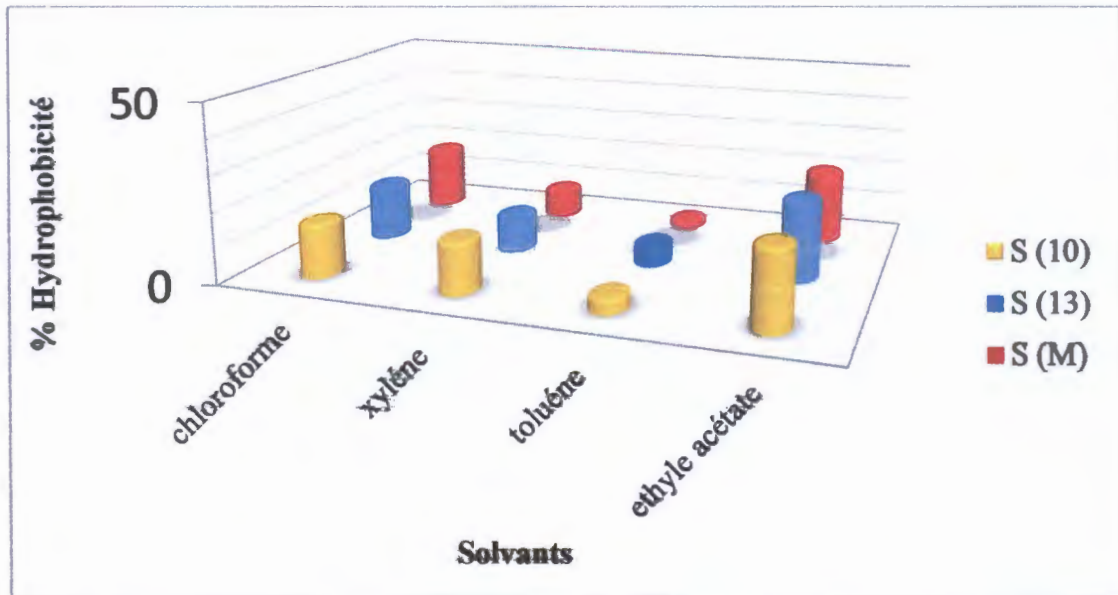


Figure 18 : Pourcentage d'hydrophobicité après deux semaines de conservation du produit

III.6.2. Auto/Co agrégation

L'agrégation des bactéries entre eux est un mécanisme à l'origine de la formation de biofilms. Elle est l'un des mécanismes d'inhibition des microorganismes pathogènes (Kos *et al.*, 2003). Les résultats d'auto-agrégation et de co-agrégation sont illustrés par la figure 19.

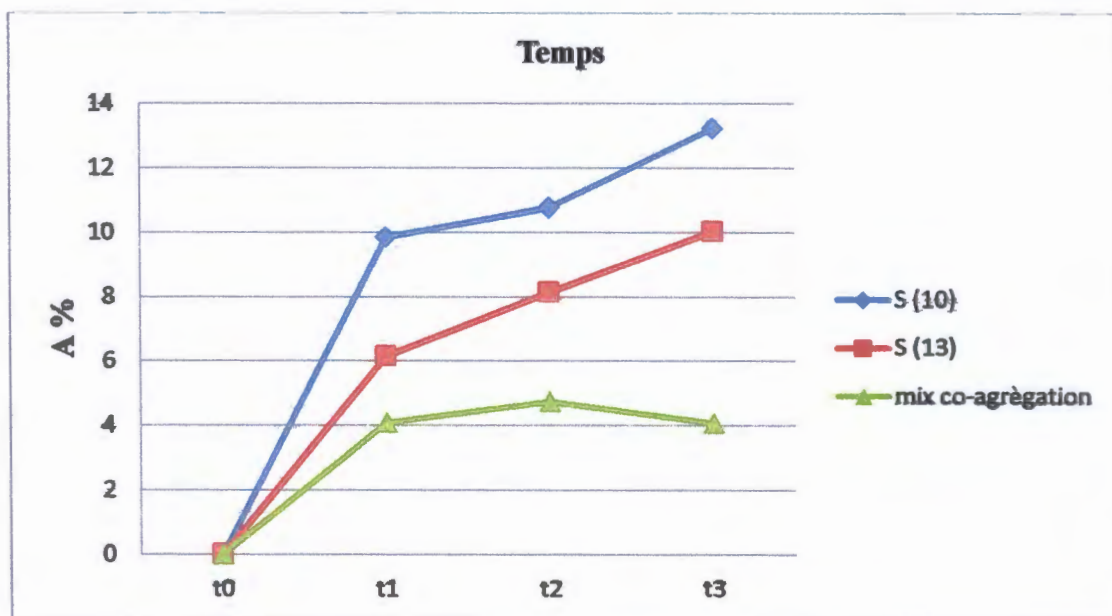


Figure 19 : pourcentage d'auto/co agrégation des cultures du produit fini.

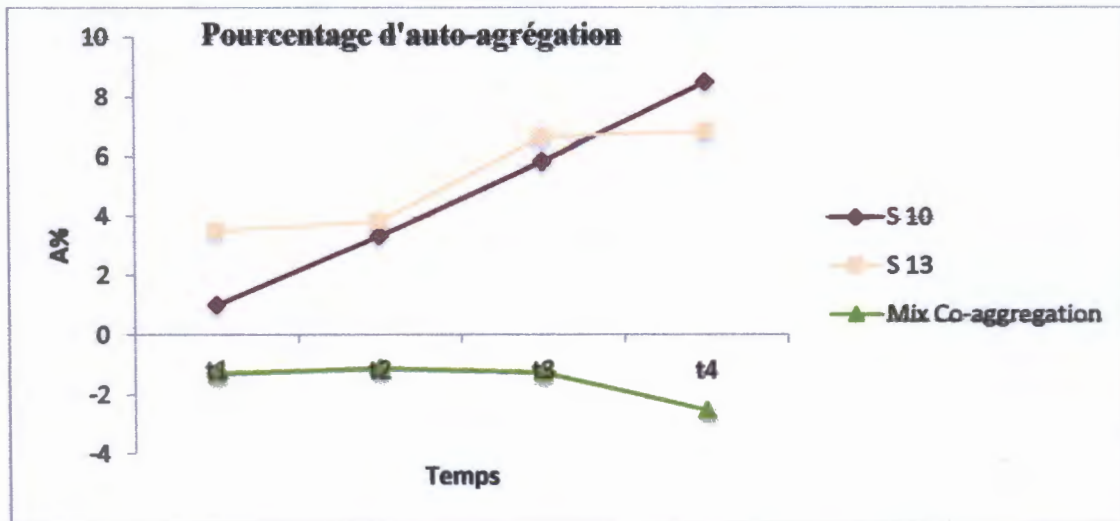


Figure 20 : pourcentage d'auto /co-agrégation du témoin.

D'après ces résultats, on remarque que les cultures récupérées des jus de carottesensemencés par *L. rhamnosus* S(10), et *L. satsumensis* S(13) possèdent un pourcentage faible d'auto-agrégation durant toute la période d'incubation qui vari entre 9,85% et 13,23% pour *L. rhamnosus* S10, et entre 6,14% et 10,04% pour *L. satsumensis* S13. La capacité d'auto-agrégation est l'un des facteurs clé qui déterminent la capacité des souches probiotiques d'adhérer aux différents tissus.

Certains lactobacilles ont une surface hydrophiles donc, ils ont une faible auto- agrégation; ceux ayants une surface hydrophobe peuvent avoir plus de chance à l'adhérence (Divyaet al. ,2012).

Le travail réalisé par Kosetal.(2003) a montré que *L. acidophilus* M92 possède un pourcentage d'auto-agrégation fort. Une étude similaire réalisée par Colladoet al.(2008) a montré que les souches *L. rhamnosus* LC-705 et *L. fermentum* ME-3 avaient une forte capacité d'auto-agrégation après 2h d'incubation. Ces données montrent que d'une souche à une autre, cette propriété peut varier. Contrairement aux résultats de ces travaux, nos souches présentent une faible auto-agrégation qui pourrait être due à l'effet produit alimentaire, ou bien à une modification des propriétés de la surface cellulaire après le lavage et mise en suspension des cellules dans le PBS (Kosetal., 2003).

Un test de co-agrégation a été réalisé entre les deux souches *L. rhamnosus* S(10) et *L. satsumensis* S(13) pour quantifier l'adhésion inter-bactérienne. Les résultats obtenus montrent un pourcentage de 4,74%, ce qui confirme le maintien de la co-agrégation.

Notre test témoin a donné un résultat opposé par rapport à ce qu'on a trouvé avec le test de co agrégation; cependant, pour l'auto-agrégation, les résultats sont similaires avec des faibles variations.

Les tests d'auto-agrégation et co-agrégation ont été réalisé après une semaine et deux semaines de conservation. Les résultats illustrés par les figures 21 et 22 montrent que les souches gardent les mêmes caractères.

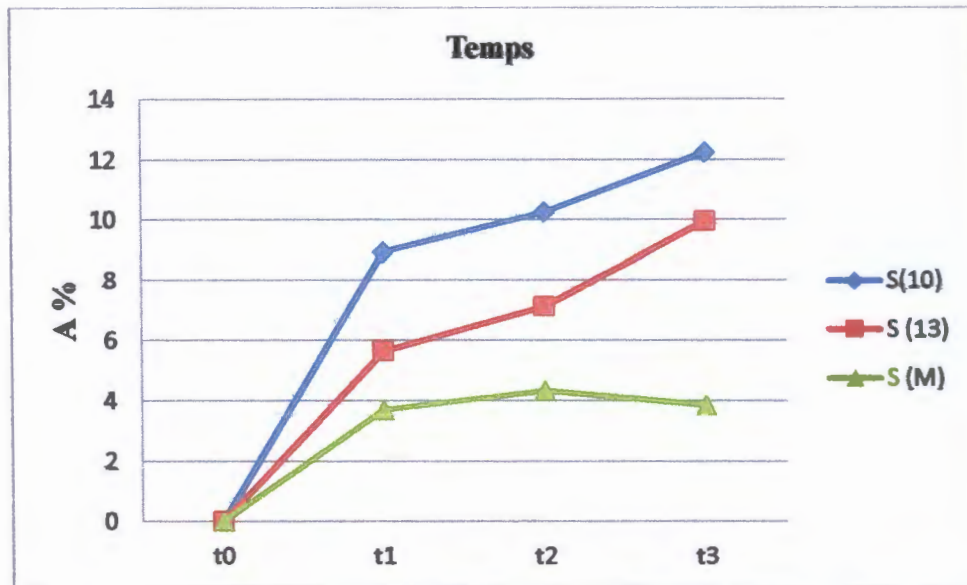


Figure 21: Pourcentage d'auto/co agrégation dans le produit après une semaine de conservation.

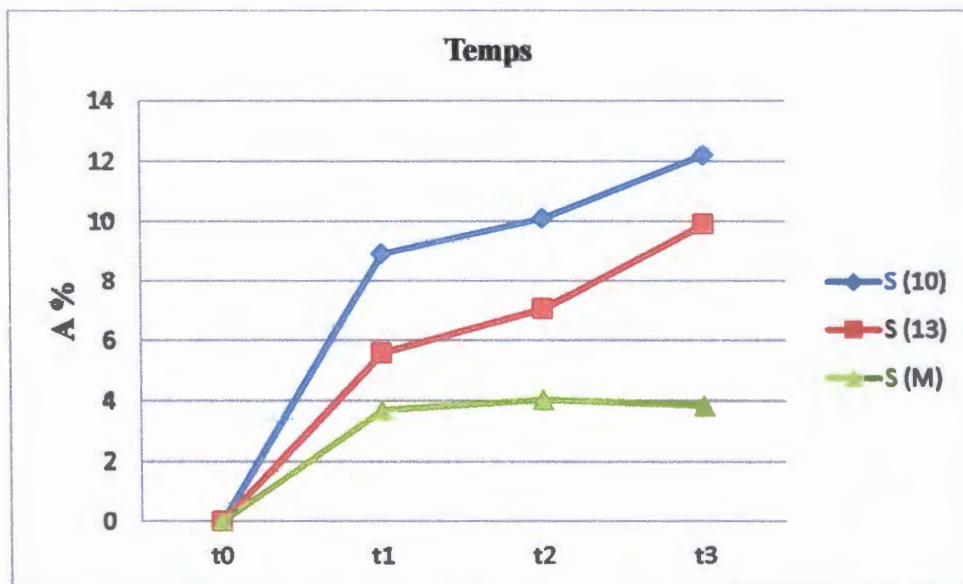


Figure 22 : Pourcentage d'auto/co agrégation dans le produit après deux semaines de conservation.

III.6.3.L'adhésion

L'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales *in vivo* est difficile à réaliser, l'adhésion *in vitro* est le modèle le plus utilisé (Gueta *et al.*, 2008). Dans notre étude, nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales de poulet de chair). L'adhésion aux cellules épithéliales humaines est un test important suggéré pour l'évaluation du pouvoir probiotique des souches lactiques (Schillinger *et al.*, 2005 ; Guglielmotti *et al.*, 2007). Cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries indésirables et la stimulation du

système immunitaire. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixations pour la colonisation (RobinetRouchy, 2001).

Avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales, on a réalisé un test de confirmation de l'efficacité des lavages pour l'élimination de la microflore adhérente. La photo 01, illustre clairement que le tissu est dépourvu de contaminants.



Photo 1 : photo-microscopique des cellules épithéliales.

Les résultats de l'adhésion des souches récupérées par centrifugation à partir du produit fini qui est le jus de carottes lacto-fermenté montrent un bon pouvoir adhésif dont les résultats illustrés par la **figure 23** en témoignent. A partir du graphe, nous constatons que le nombre de cellules adhérentes est en augmentation pour l'ensemble des cultures et que le temps d'incubation agit en faveur de cette aptitude probiotique. Nous avons remarqué également qu'il n'y a pas vraiment une différence notable entre l'aptitude à l'adhésion des cellules bactériennes.

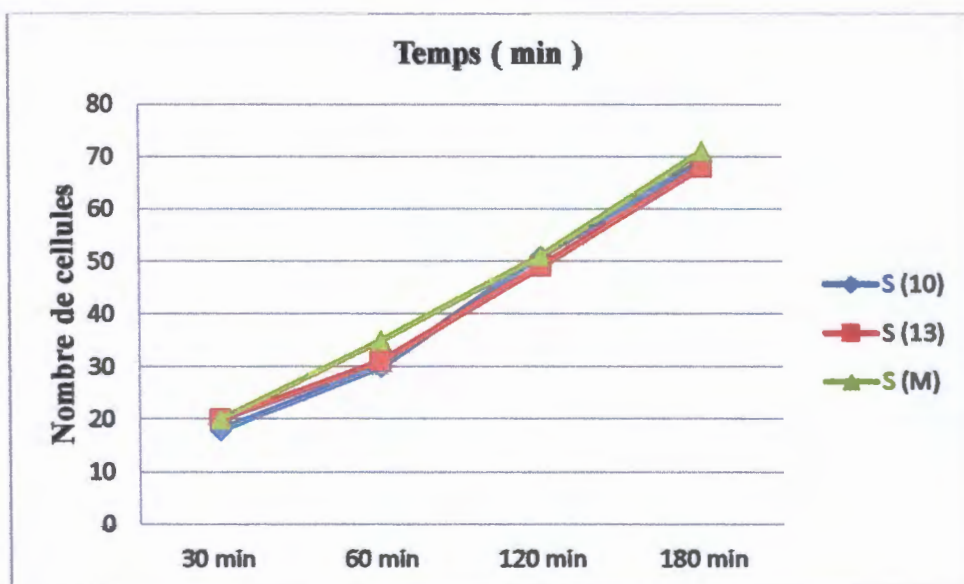


Figure 23 : Nombres de cellules adhérentes aux cellules épithéliales pendant 3h d'incubation.

III. Résultats et Discussion

L'observation microscopique, photo 2,3 et 4 montrent clairement le nombre de cellules adhérentes aux cellules épithéliales

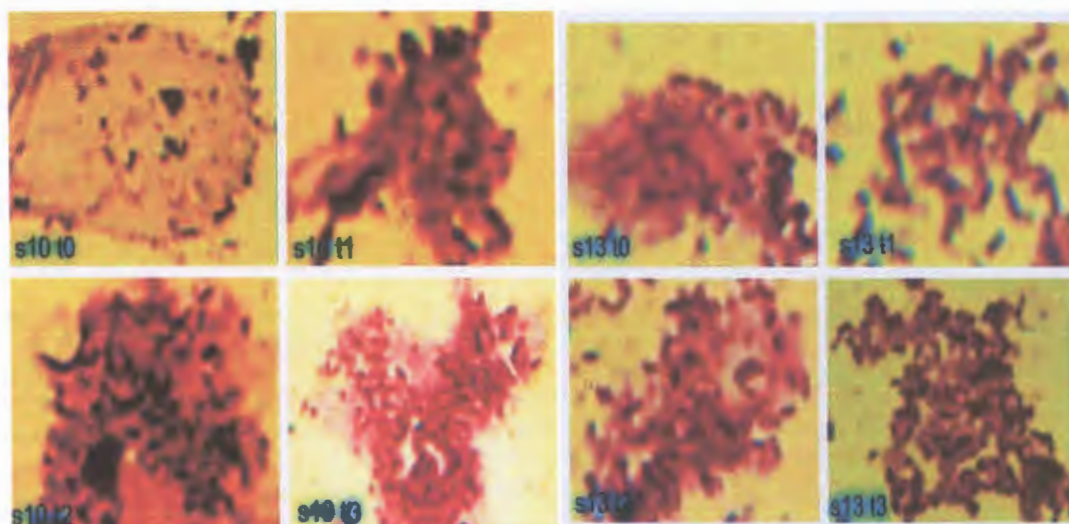


Photo 2 : photo microscopique d'adhésion de *L. rhamnosus* S(10) aux cellules épithéliales

Photo 3 : photo microscopique d'adhésion de *L. satsumensis* S(13) aux cellules épithéliales

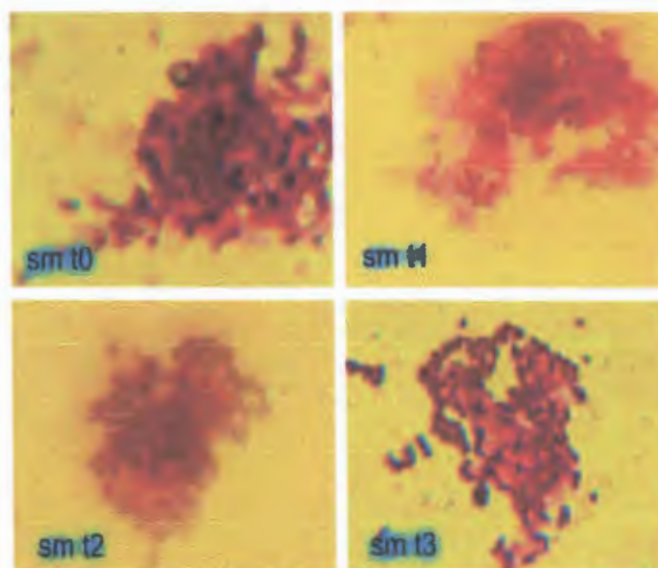


Photo 4 : photo microscopique d'adhésion de mixture aux cellules épithéliales

La capacité d'adhérence est en relation avec l'origine des probiotiques. D'après Gueta *et al.* (2008), les bactéries d'origine humaine ont la meilleure aptitude à adhérer aux muqueuses intestinales de l'homme. Cependant Kimoto-Nira *et al.* (2009) ont trouvé que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis* sp. *lactis* et *Lc. lactis* sp. *cremoris*) isolées de divers produits laitiers, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines. Par ailleurs, Wang *et al.* (2010) ont prétendu que les conclusions tirées des résultats des études *in vitro* ne puissent être directement appliquées aux

III. Résultats et Discussion

situations *in vivo*. Il a été montré qu'il existe une relation entre la capacité d'adhérence et la colonisation provisoire de l'intestin humain.

Les résultats du test d'adhésion après 1 semaine et 2 semaines de conservation sont illustrés dans les figures ci-dessous. Il apparaît qu'il y a un effet modéré de conservation à 4°C, les souches gardent le même pouvoir adhésif après conservation.

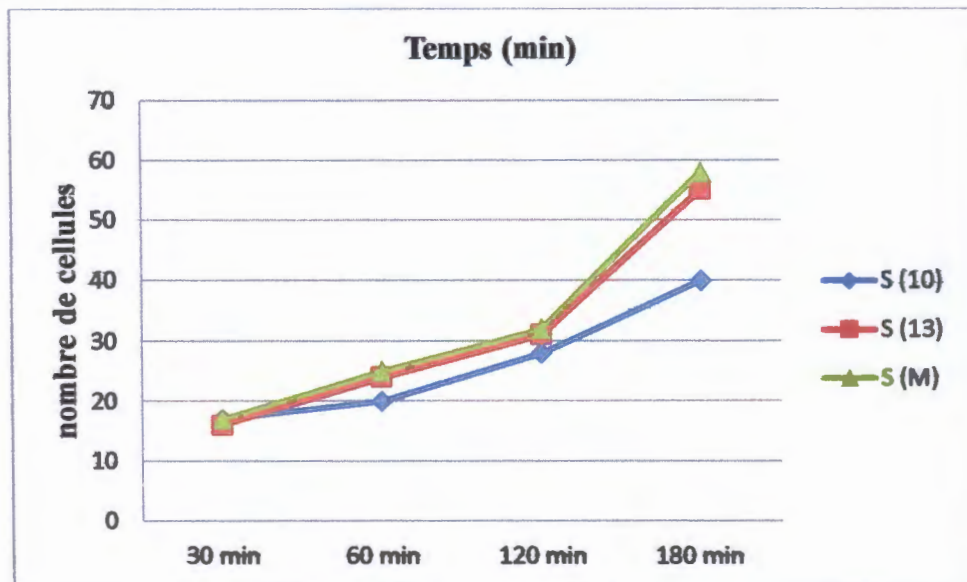


Figure 24 : Nombres de cellules adhérentes aux cellules épithéliales après une semaine de conservation

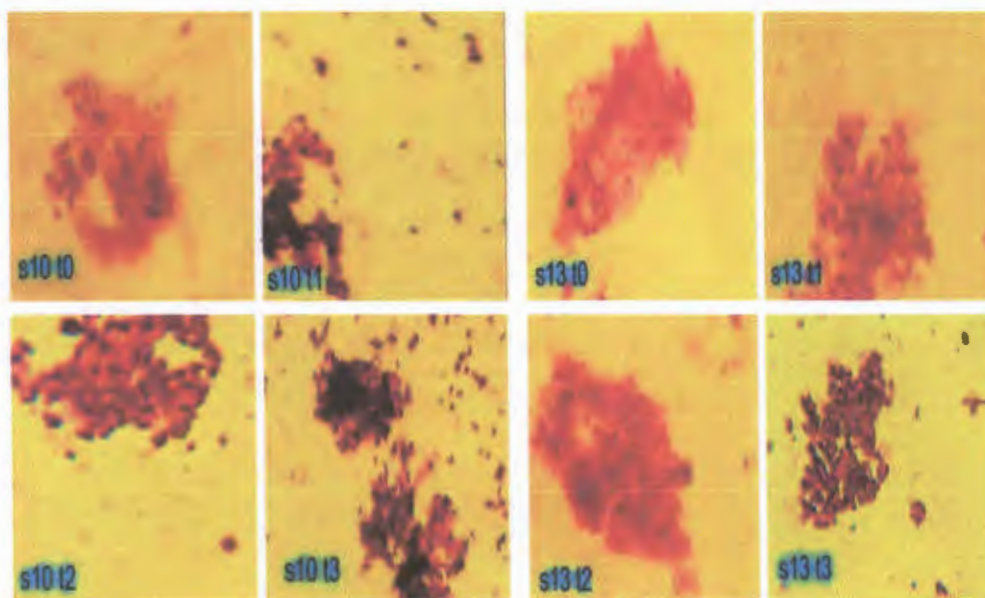


Photo 5 : photo microscopique d'adhésion de *L. rhamnosus* aux cellules épithéliales après une semaine conservation

Photo 6 : photo microscopique d'adhésion de *L. satsumensis* aux cellules épithéliales après une semaine conservation

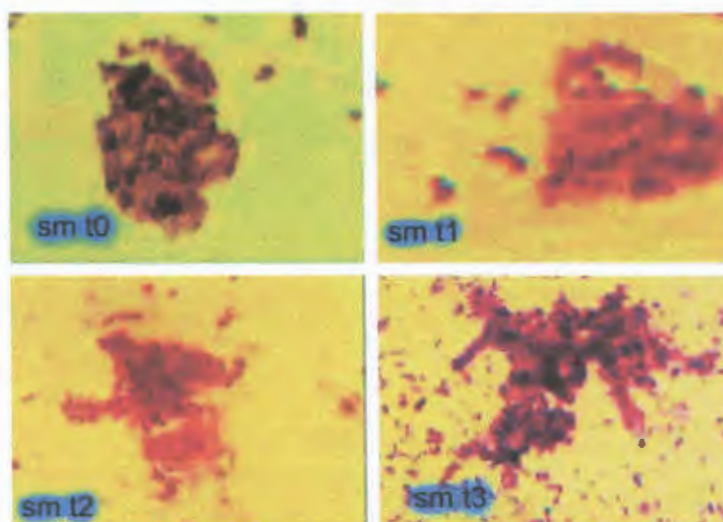


Photo 7 : photo microscopique d'adhésion de la mixture aux cellules épithéliales après une semaine conservation

Par ailleurs, les résultats de l'adhésion des cellules récupérées du produit après deux semaines de conservation à 4°C montrent qu'il n'y a pas une perte de cette propriété et que le meilleur résultat est obtenu avec *L.satsumensis* et la mixture (figure 25), cependant, nous constatons que le temps d'incubation agit en faveur de l'adhésion.

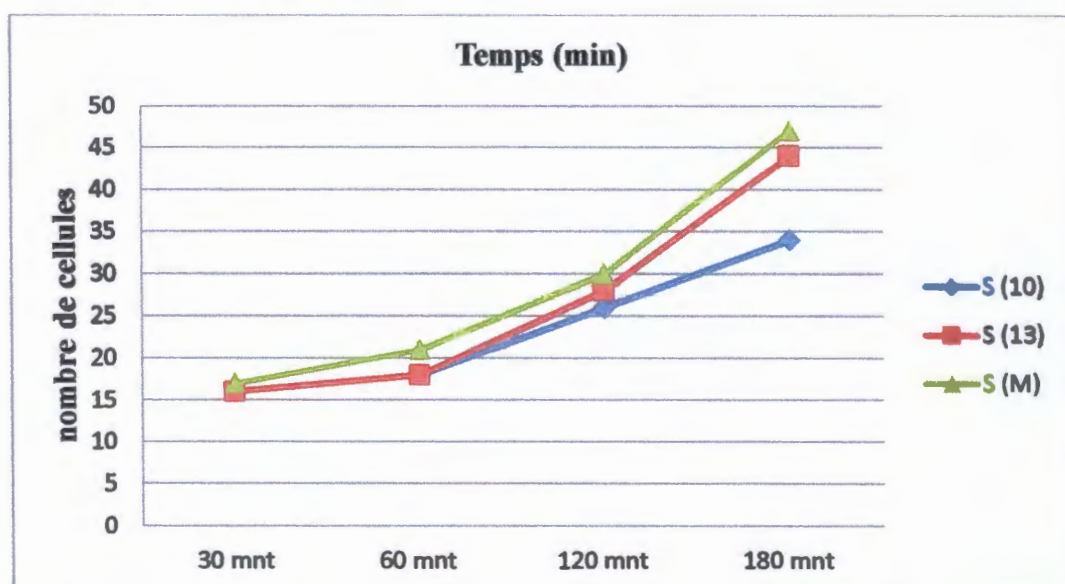


Figure 25 : Nombres de cellules adhérentes aux cellules épithéliales après deux semaines de la conservation.

Les photos 08, 09 et 10 concrétisent la bonne adhésion des cellules, que le temps d'incubation est en faveur de cette propriété et que qu'il n'y a aucun effet de l'interaction matrice alimentaire-conservation.

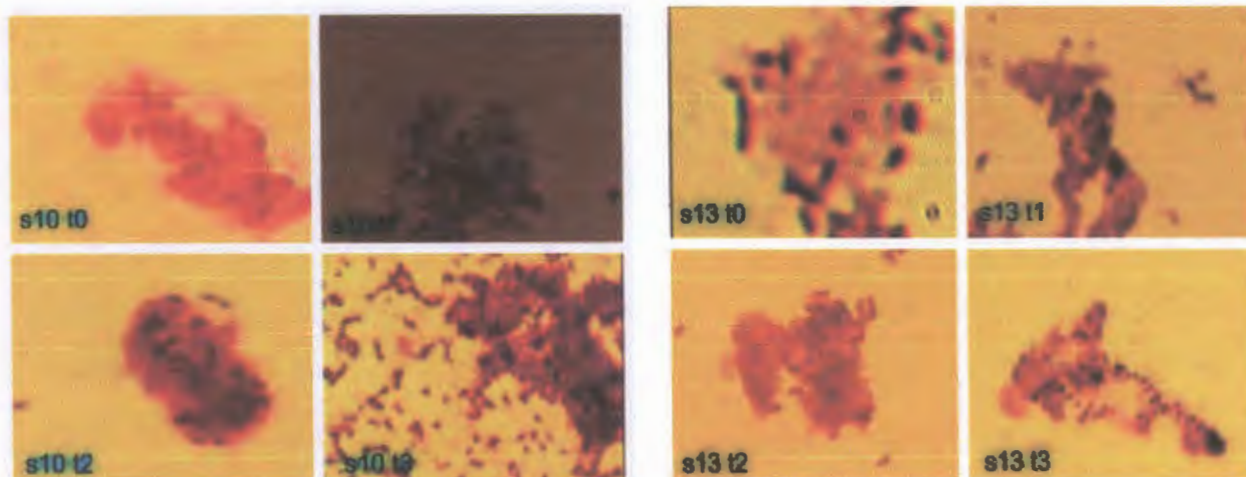


Photo 8 : photo microscopique d'adhésion de *L. rhamnosus* aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation

Photo 9 : photo microscopique d'adhésion de *L. satsumensis* aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation

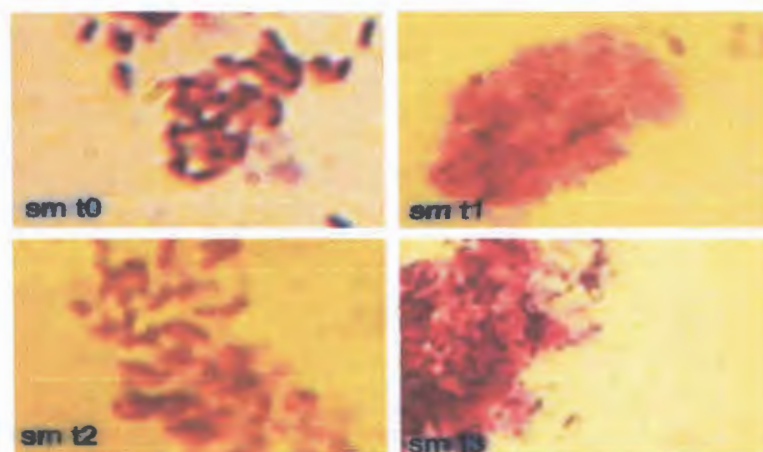


Photo 10: photo microscopique d'adhésion de la mixture aux cellules épithéliales après deux semaines de conservation



Conclusion

Les consommateurs modernes sont de plus en plus intéressés par leur santé personnelle, et s'attendent à des aliments capables de prévenir la maladie. La santé gastro-intestinale est le secteur clé dans le marché mondial des aliments fonctionnels et ce secteur est dominé par les produits probiotiques. Pour que les probiotiques aient des effets bénéfiques sur l'hôte, les cultures probiotiques livrées dans une matrice alimentaire composée tel que le jus de carottes doivent demeurer viables durant toute la période de stockage réfrigéré. Le but de cette étude était l'évaluation de l'effet de la matrice alimentaire et la conservation sur la viabilité des souches de *Lactobacillus* et sur leurs aptitudes probiotiques.

Dans une première approche, nous avons contrôlé la qualité du jus de carotte par la détermination des différents paramètres physico chimiques couplé à un contrôle microbiologique, ensuite on a suivi la viabilité des souches ensemencé dans le jus par la détermination du nombre de cellules viables dans le produit fini.

La deuxième partie a été axée sur l'étude des aptitudes probiotiques telles que l'hydrophobicité, l'adhésion et l'auto- agrégation des souches probiotiques

Les résultats ont montré que la qualité de jus est satisfaisante et qu'il n'y à aucun effet de l'interaction matrice alimentaire- conservation sur la viabilité des souches. Par ailleurs, les résultats de l'étude *in vitro* ont montré que, les souches de *Lactobacillus* et leur mixture ré-isolées de la matrice alimentaire maintiennent leurs aptitudes probiotiques, de même, il apparait que la conservation sous régime du froid n'altère en aucun cas les l'hydrophobicité, l'auto-agrégation et la capacité de s'adhérer au tissu épithéliale.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Donc pour compléter ce travail sur l'effet de la matrice alimentaire et la conservation sur la viabilité des souches lactobacilles et leur aptitudes probiotique, nous proposons :

- Sur le plan technique, l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision des cellules viables ;
- Sur le plan technologique : estimation de la résistance aux bactériophages, car cette caractéristique est directement reliée à la réussite ou non de la production de jus ;
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités ; métaboliques des bactéries lactiques ;
- Une évaluation de la qualité sensorielle de jus.

A

Abdulla, A. A., Abed, T. A., & Saeed, A. M. (2014).Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *British Microbiology Research Journal*, 4(4), 3817

Alwazeer, D., Delbeau, C., Divies, C., & Cachon, R. (2003).Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. *International journal of food microbiology*, 89(1), 21-29.

AOAC.(2000). *Official Methods of Analysis*.17thEd. Maryland. U.S.A. 360.

B

Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., &Kodjikian, L. (2010).Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 33(3), 210-221.61.

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

Bergey DH, Holt JG, Krieg NR. (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology 1st ed.* Williams, Wilkins Co.

BordjahAkli. (2011). Analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-écrémé BTS en contrôle de qualité dans les industries agroalimentaires 2011.*Centre de formation professionnelle El Hidhab Sétif Algérie*

Bouix D &Leveau J.Y.(1980). Les levures : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, le contrôle microbiologique. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali. 2: 159-1*

C

Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005).Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical reviews in food science and nutrition*,45(1), 61-84.

Clara, G., Suárez, A., Fernández-García, M., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2011). Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line

is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Research in microbiology*, 162(5), 514-519.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological methods*, 71(1), 71-74.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, 226(5), 1065-1073.

D

Da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

Daneshi, M., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., & Labbafi, M. (2013). Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5), 5-5.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438-442.

Demir, N., BAHÇECİ, K. S., & Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 352-363.

Dimitrov, Z., Gotova, L., & Chorbadjiyska, E. (2014). In vitro characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(6), 1079-1083.

Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(5), 1314-1324.

Do Espirito Santo, A. P., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2011). Influence of food matrices on probiotic viability—a review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology*, 22(7), 377-385.

Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires/Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

E

Ekmekci H., Aslim B., & Ozturk S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiology and immunology*, 53:59-65.

Engstrand, L., Drago, L., Reid, G., Schaubert, J., Hay, R., & Rowland, I. (2012). Human microbiota in health and disease. *SelfCare Journal*, 3, 1-68.

F

FAO/WHO. (2001). Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Farnworth E.R. (2008). Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*, 1 pp: 57-68.

G

Greifová, Z., Kohajdová, J., & Karovičová, M. (2006). Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(3), 115-119.

Gu, R. X., Yang, Z. Q., Li, Z. H., Chen, S. L., & Luo, Z. L. (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*, 14(6), 313-317.

Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2011). Biosurfactant-producing Lactobacilli: Screening, Production Profiles, and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Science*.

Guglielmotti, D. M., Marcó, M. B., Golowczyc, M., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. D. L. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, 17(8), 916-925.

Guiraud, J. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Edition : Paris.

Guiraud, J. P., & Rosec, J. P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR.

J

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. & Karam N.E. (2009). Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan". a traditional butter from sheep's milk: isolation. Identification and major technological traits. *Gr. y .Aceites*, 60(2): 177-183

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

Izquierdo E. (2009). Les protéines bactériennes tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat, *Université de Strasbourg* : 8-141.

J

Janek, T., Łukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 379-386.

Jankovic, L., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.

Jayamanne, V. S., & Adams, M. R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in applied microbiology*, 42(3), 189-194.

K

- Kailasapathy, K. (2013).** Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. *International Journal of Fermented Foods*, 2(1), 1.
- Kias, A., & Kriket, A. (2015).** Etude de la corrélation entre l'adhésion, l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de quelques *Lactobacillus* probiotique. *Université de jijel*.
- Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., & Suzuki, C. (2009).** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. *International journal of food microbiology*, 131(2), 183-188.
- Kjeldhal J. (1883).** Meue method lurk besyimmung des stichs offs in organischem korpon. *Z Anal. Chem.*, 22.366-382.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003).** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., & Hoschke, Á. (2008).** Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry*, 43(8), 816-821.

L

- Leahu, A., Damian, C., Carpiuc, N., Oroian, M., & Avramiuc, M. (2013).** Change in colour and physicochemical quality of carrot juice mixed with other fruits. *Journal of Agroalimentary processes and technologies*, 19, 241-246.
- Luquet. (1985).** lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre, V1.ED. Tec & Doc. Lavoisier .Paris.
- Lecoq R. (1965).** Manuel d'analyses alimentaires et expertises usuelles. *Doin*. Paris. 1304-1311.
- Ly-Chatain, M. H., Le, M. L., Le Thanh, M., Belin, J. M., & Waché, Y. (2010).** Cell surface properties affect colonisation of raw milk by lactic acid bacteria at the microstructure level. *Food research international*, 43(6), 1594-1602.
- Lin, T. Y., & Chien, M. F. C. (2007).** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419-1423.

M

- Mayra-Makinen, A., & Bigret, M. A. R. C. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 139, 175-198.
- McFarland, L. V. (2006).** Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *The American journal of gastroenterology*, 101(4), 812-822.
- Monnet, C., Latrille, E., Béal, C., & Corrieu, G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*, np.
- Moreau C. (1980).** Les moisissures : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires, le contrôle microbiologique. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali.* 3 : 331-333.

N

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Sada, A., & Orlando, P. (2008).** Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2271-2276.

O

- Organisation Mondiale de la Santé. (2002),** stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : *Une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé* ; Genève ; 28 p.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279-289.

P

- Pan, W. H., Li, P. L., & Liu, Z. (2006).** The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12(3), 148-152.
- Palomares I, C., Pérez-Morales, R., & Acedo-Félix, E. (2007).** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev Latinoam Microbiol*, 49(3-4), 46-54.
- Pascual, L., & Barberis, L. (2011).** *Prevention Strategy of Urogenital Infections by Using Lactobacilli with Probiotic Properties*. INTECH Open Access Publisher.

Pascual, L. M., Daniele, M. B., Ruiz, F., Giordano, W., Pájaro, C., & Barberis, L. (2008). Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *The Journal of general and applied microbiology*, 54(3), 141-148.

Patterson C.A. (2008). Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. AAFC. 1-4.

Pinto, M. G. V., Gómez, M. R., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology*, 133(1), 86-93.

R

Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.

Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and infection*, 4(3), 319-324.

Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.

Robin J.M. et Rouchy A. (2001). Les probiotiques. *CEDN. Nutrithérapie. Info*. 1-4.

Roos, S., & Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from Lactobacillus reuteri 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148(2), 433-442.

Roy .(2011). *Probiotics* :Université Laval, Quebec City, QC, Canada

S

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

Sakamoto, M., & Komagata, K. (1996). Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(3), 210-216.

Salminen, S., Gorbach, S., YuanKun, L., Benno, Y., von Wright, A., & Ouwehand, A. (2004). Human studies on probiotics: what is scientifically proven today?. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, (Ed. 3), 515-530.

- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Supplement 2), S58-S61.
- Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15(12), 1289-1297.
- Servin, A. L., & Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.
- Shakirova, L., Grube, M., Gavare, M., Auzina, L., & Zikmanis, P. (2013). Lactobacillus acidophilus La5 and Bifidobacterium lactis Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(1), 85-93.
- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., & Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *Journal of food science and technology*, 49(1), 22-32.
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423-431.
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1-8.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., & Thaker, V. (2011). Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S287-S290.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Southgate D. & Johnson I. (1993), "Food processing", édition : "Human nutrition and dietetics 9th Edition"
- Surawicz, C. M. (2003). Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile diarrhoea in humans. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 775-783.

T

Tailliez P. (2004) . Lactobacilli / properties , habitat, physiological, role and importance in human health . *Antibiotiques*, 6 : 35-41.

Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., & Nguyen, M. H. (2004).Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International journal of food science & technology*, 39(6), 605-611.

Tamime A.(2005). Probiotic Dairy Products.Dairy Science and Technology Consultant.*Blackwell publishing*: 56-62.

Tamime, A. Y. (2002).Microbiology of starter cultures. *Dairy Microbiology Handbook. The microbiology of milk and milk products*, 261-366.

Tamminen, M., Salminen, S., &Ouwehand, A. C. (2013). Fermentation of carrot juice by probiotics: Viability and preservation of adhesion. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2(1), 10.

Tomás, J., Wiese, B., & Nader-Macías, 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(6), 1383-1391.

V

Vinderola, C. G., Medici, M., &Perdigon, G. (2004).Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria.*Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 230-243.

W

Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., &Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585.

y

Youssef, D., Miloud, H., Eddine, M. A., &Mebrouk, K. (2016).Effect of Cold Storage and Industrial Aromas on the Viability of Bifidobacteria in Fermented Dairy Products. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 11(1), 18-23.



Annexes

Annexe I : composition des milieux de culture et tampons

❖ Eau physiologique

Ingrédients	Unité
Na Cl	9 g
Eau distillée	1000 ml

❖ Tampon phosphate urée sulfate magnésium pH 7

Ingrédients	Unité
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	22.2 g
KH ₂ PO ₄	7.26 g
Urée	1.8 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.02 g
Eau distillée	1000 ml

❖ Bouillon phosphate saline (PBS) pH 7

Ingrédients	Unité
K ₂ HPO ₄	1.21 g
KH ₂ PO ₄	0.34 g
NaCl	8g
Eau distillée	1000 ml

❖ Bouillon Man-Rogosa-Sharpe (MRS) pH 5.8

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

❖ *Gélose nutritive:*

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

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

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

Annexe 2 : résultats des paramètres physico-chimiques

❖ *pH et acidité du lait fermenté (starter)*

souches	S10	S13	SM
pH	4.08	4.07	4.09
Acidité (°D)	30	35	40

❖ *pH du jus lacto-fermenté au cours de fermentation*

Echantillons De jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
pH T ₀	5.41	5.44	5.35
pH T ₁	5.24	5.30	5.20
pH T ₂	4.01	4.02	4
Ph T ₃	3.9	3.92	3.84

❖ *pH du jus lacto-fermenté après conservation*

Echantillons De jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
pH après 3 jours	3.88	3.88	3.86
pH après 6 jours	3.87	3.84	3.74
pH après 9 jours	3.86	3.84	3.70

❖ *Acidité du jus lacto-fermenté*

Echantillons De jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Acidité T ₀	8	5	6
Acidité T ₁	8	5	6
Acidité T ₂	22	20	25
Acidité T ₃	30	30	31

❖ *Acidité du jus lacto-fermenté après conservation*

Echantillons De jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Acidité 3 jours	35	38	35
Acidité 6 jours	43	46	42
Acidité 9 jours	52	55	53

❖ *la teneur en sucres totaux*

Echantillons de jus	Jus pur	Jus ensemencé par S(10)	Jus ensemencé par S(13)	Jus ensemencé par la mixture
Teneurs en sucres totaux (%)	5.27	3.88	3.51	4.6

❖ *teneur en polyphénols*

Echantillons de jus	Jus pur	Jus ensemencé par S(10)	Jus ensemencé par S(13)	Jus ensemencé par la mixture
Teneurs en polyphénols mgEAG/100ml	339	270	180	269

❖ *Teneur en vitamine C*

Echantillons de jus	Jus ensemencé par S(10)	Jus ensemencé par S(13)	Jus ensemencé par la mixture	Jus pur
Teneur en vitamine C (%)	0.44 %	0.44 %	0.44 %	0.8 %

❖ *Teneur en matière sèche*

Echantillons de jus	Jus ensemencé par S(10)	Jus ensemencé par S(13)	Jus ensemencé par la mixture	Jus pur
Teneur en Matière sèche (%)	7.4 %	7.3 %	7.7 %	5.9 %

❖ *Teneur en matière minérale*

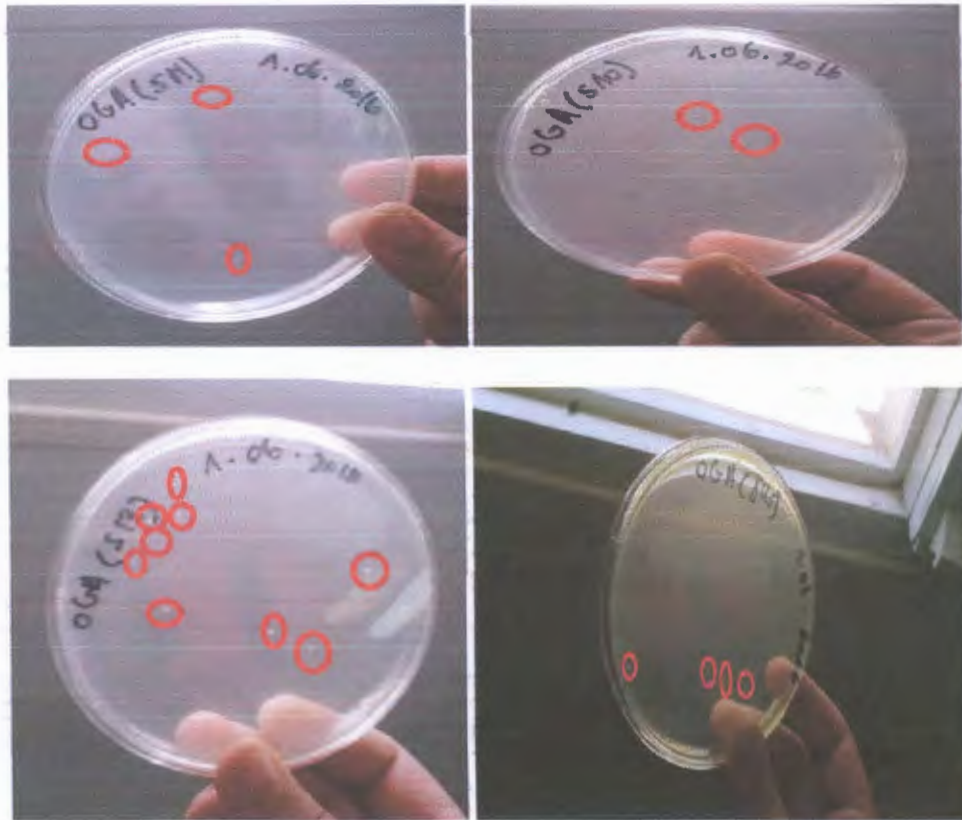
Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture	Jus pur
Teneur en Matière sèche (%)	7.4 %	7.3 %	7.7 %	5.9 %

❖ *Teneur en matière azoté et en protéines*

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture	Jus pur
Teneur en matière azotée (%)	0.16 %	0.14 %	0.15 %	0.17 %
Teneur en protéine (%)	1.06 %	0.87 %	1 %	0.96 %

Annexe 3: résultats microbiologiques

❖ Résultats de dénombrement des levures et moisissures.



❖ Résultats de dénombrement de la flore aérobie mésophile total (FTAM)



❖ *Nombre de cellules au cours de fermentation*

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Nombre de cellules à T ₀ ($\times 10^{12}$ UFC /ml)	5	6	9
Nombre de cellules à T ₁ ($\times 10^{12}$ UFC /ml)	12	11	13
Nombre de cellules à T ₂ ($\times 10^{12}$ UFC /ml)	17	16	19
Nombre de cellules à T ₃ ($\times 10^{12}$ UFC /ml)	22	21.33	23.66

❖ *Nombre de cellules après conservation*

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
nombre de cellules après 3 jours	5	5.33	5.66
Nombre de cellules après 6 jours	3.66	4.33	4
Nombres de cellules après 9 jours	3	2.66	3.33

Annexe 4 : résultats des aptitudes probiotiques**❖ Hydrophobicité produit fini**

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Xylène	14.94	10.71	8.11
Toluène	4.35	6.30	2.11
Chloroforme	15.89	16.65	19.32
Ethyle acétate	21.65	24.87	20.82

❖ Hydrophobicité après une semaine de conservation

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Xylène	13.87	10.14	8.21
Toluène	5.61	6.10	2.03
Chloroforme	15.35	15.79	18.07
Ethyle acétate	21.68	22.23	20.04

❖ Hydrophobicité après deux semaines de conservation

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
Xylène	14.57	10.64	8.39
Toluène	4.33	6.16	2.37
Chloroforme	15.28		
Ethyle acétate			

❖ Auto/co-agrégation produit fini

Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
T0	0	0	0
T1	9.85	6.14	4.08
T2	10.77	8.14	4.74
T3	13.23	10.04	4.06

❖ *Auto/co-agregation après une semaine de conservation*

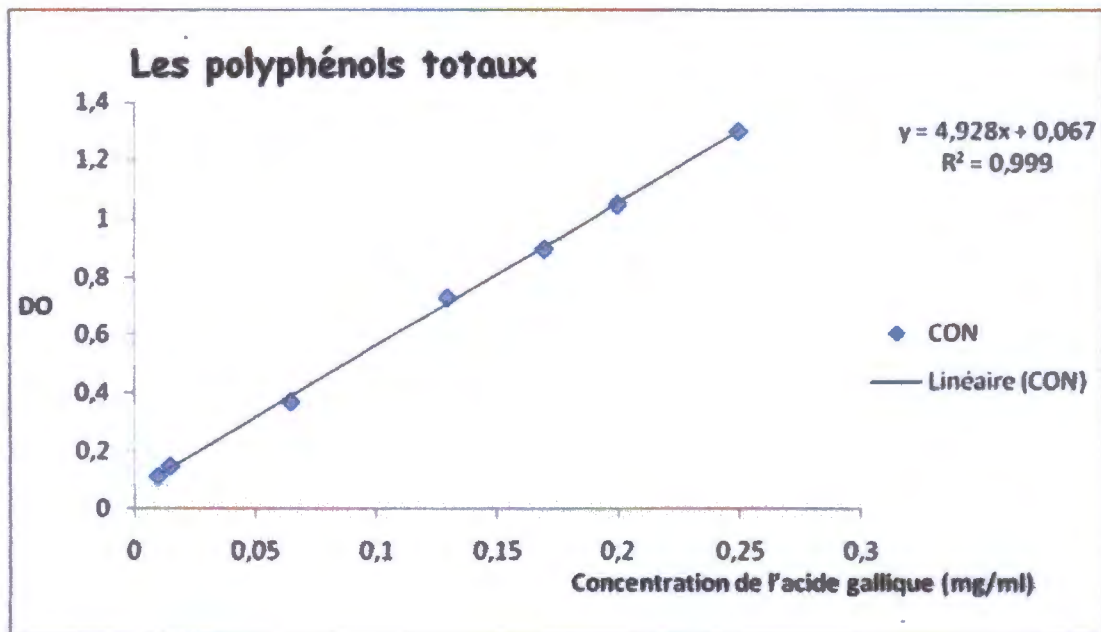
Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
T0	0	0	0
T1	8.94	5.65	3.72
T2	10.25	7.13	4.35
T3	10.26	9.96	3.87

❖ *Auto/co-agregation après deux semaines de conservation*

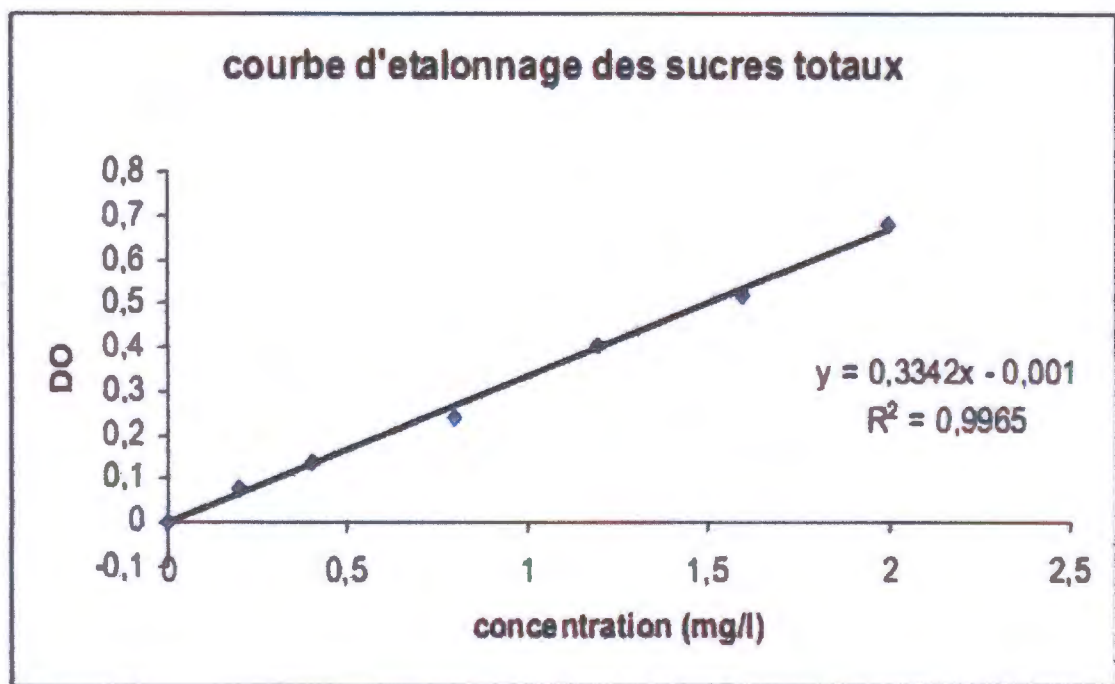
Echantillons de jus	Jusensemencé par S(10)	Jusensemencé par S(13)	Jusensemencé par la mixture
T0	0	0	0
T1	8.93	5.59	3.70
T2	10.11	7.06	4.05
T3	23.23	9.91	3.86

Annexe 5 : courbes d'étalonnages

❖ Courbe d'étalonnage des polyphénols g/l (acide gallique).



❖ Courbe d'étalonnage des sucres totaux (Glucose).



Annexe 6 : Coloration de Gram

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

- Sur **une lame**, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
 - Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
 - Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
 - Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
 - Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
 - Laver à l'eau ;
 - Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).
- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.**

Présenté par :
Boubezari imene
Boubendir asma

Jury :
Encadreur : Idoui .T
Examineur : Boudjerda .D
Président : Boubezari .T

Date de soutenance :
29.06.2016

Thème

Evaluation de l'effet de la matrice alimentaire et conservation sur la viabilité des *Lactobacillus* et leurs aptitudes probiotiques

Résumé

Les bactéries lactiques sont douées des propriétés bénéfiques, elles sont utilisées comme probiotique dans plusieurs domaines, à savoir la production des boissons lacto-fermentés. Dans cette étude nous avons étudié l'effet d'une matrice alimentaire et la conservation sur la viabilité des *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* S10, *L. satsumensis* S13 et leur mixture) et leur aptitudes probiotiques. Ces souches sont utilisées pour la production d'un jus de carotte lacto-fermenté, après un contrôle de la qualité du jus nous avons étudié l'effet de ce jus sur l'hydrophobicité, l'auto-agrégation et l'adhésion des souches aux cellules épithéliales. Les résultats montrent que les souches gardent leur viabilité et leurs aptitudes probiotiques après une longue durée de conservation.

Mots clés : aptitudes probiotiques, viabilité, auto-agrégation, adhésion, hydrophobicité.

Abstract

Lactic acid bacteria have different benefic properties; they are used as a probiotic in several areas such as the production of lacto-fermented beverages. In this study we are investigated the effect of the food matrix and conservation on the viability of *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* 10, *L. satsumensis* 13 and their mixture), and probiotics abilities. These strains are used to produce a lacto-fermented carrot juice then we have controlled its quality. On the other hand the in vitro study of hydrophobicity, auto-aggregation and epithelial cell adhesion

The results shows that the strains keep their viability and probiotic ability after a long period of conservation

Key words: probiotic ability, viability, auto-aggregation, adhesion, hydrophobicity.

ملخص

بهدف دراسة تأثير المادة الغذائية وطرق حفظ الأغذية على حياة ونمو بكتيريا اللاكتوباسيلوس وتأثيرهما على الكفاءة البروبيوتكية. قمنا بمراقبة الجودة والنوعية لعصير الجزر المخمر لبني المحضر في المختبر وذلك بزراعة نوعين من سلالة اللاكتوباسيلوس و مزيجهما بالإضافة إلى دراسة تأثيرها على الخاصية الهيدروفوبية وقابلية الالتصاق الذاتي و الالتصاق بالخلايا المعوية.

النتائج أظهرت بقاء البيكتيريا حية و حفاظها على كفاءتها البروبيوتكية رغم طول مدة الحفظ.

الكلمات المفتاحية الكفاءة البروبيوتكية ، قابلية النمو ، الالتصاق الذاتي ، الخلايا المعوية . الخاصية الهيدروفوبية .

