

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et sécurité alimentaire

Présenté par :

MOUAZ Ikram

BENHAOUCHE Wahida

OTMANE Imene

Thème

**Préparation pharmaceutique à base
d'exopolysaccharides des bactéries
lactiques**

Soutenu publiquement le 06/07/2023

Jury:

Président: MEDJBER. Nacera

Encadrant: KHADEM. Hafidha

Co-encadrant: MEZOUAR. Djamila

Examineur1 : BOUBAKEUR. Badra

Examineur2: BEZZERROUK .Mohamed

Examineur3: MEHRROUZZE Ikram

Grade

MCB Univ. Tiaret.

MCB Univ. Tiaret.

MCA Univ. Tiaret.

MCA..... Univ. Tiaret.

Pr..... Univ.Tiaret

Dr en médecine

Année universitaire 2022-2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute nos gratitude.

Tout d'abord, grâce à DIEU, le tout puissant, le miséricordieux, pour la force, le courage, la volonté, la santé qu'il nous a donné pour la réalisation de ce travail.

Nous voudrions adresser avant tout nos reconnaissances à notre encadrante Mme KHADEM Hafidha pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

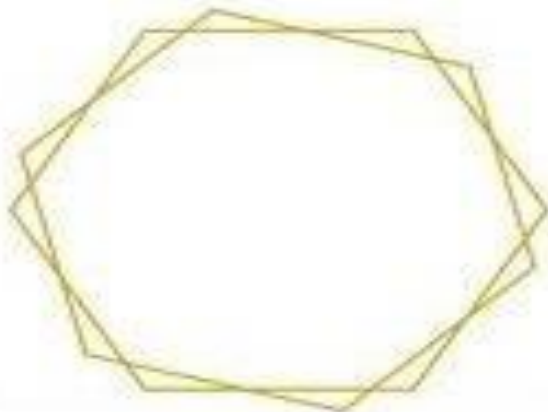
Nous adressons aussi nos remerciements à notre Co-encadrante Mlle MEZOUAR Djamilia. Nous tenons à remercier spécialement Mlle BOUBAKEUR Badra, qui fut la première à nous faire découvrir le sujet qui a guidé notre mémoire.

Nous tenons à remercier et exprimer nos profondes gratitude à Mme. MEDJBER.N pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à présider le jury de la soutenance de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à nos chers invités Pr BEZZERROUK M .A et Mme MEHRROUZE qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'enrichir le débat de notre soutenance.

Nous désirons aussi remercier nos chers enseignants et le personnel du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie et en particulier Mlle SOUALEM.K et Mme HABBICHE .M qui nous ont fourni un milieu favorable et nous ont aidé lors de la réalisation de notre expérimentation.

Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.



DEDICACES

Alors que je me tiens ici aujourd'hui, je me souviens des innombrables façons dont Dieu m'a béni. Son amour et ses conseils m'ont amené à ce moment, et je suis honoré d'exprimer ma plus profonde gratitude et mes remerciements.

A mon cher père Elhadj

A ma chère mère Rebha

Je dédie ce mémoire à mes chers parents qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de mes études. En signe de reconnaissance qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études.

A mes chers frères et chères sœurs et leurs enfants

Je les remercie pour leur soutien moral et leurs précieux conseils tout au long de mes recherches et leur encouragement.

A mes chers amis

A tout ceux qui ont su m'apporter aide et soutien aux moments propices. Je leurs dédie ce travail ; j' y suis tellement reconnaissante.

A toute a famille Mouaz, Maremi, Labгаа, Bekhadra et Omran

Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux et le fruit de votre soutien infaillible
Merci d'être toujours là pour moi.

MOU AZ IKRAM



DEDICACES

A mon cher grand-père

C'est vrai qu'il n'est pas avec nous pour me voir aujourd'hui, mais il reste l'homme le plus important pour moi, car il constituait la première et la principale motivation de ce que j'ai réalisé aujourd'hui. Merci pour vos efforts et votre amour pour moi.

A ma grand-mère adorée

Qui a partagé avec moi chaque moment d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Vous m'avez chaleureusement soutenu et encouragé tout au long de mon parcours.

Que Dieu tout puissant vous protège et vous accorde santé et longue vie.

A ma mère et mon père

Pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance.

A toute ma famille

Aucun mot ne peut exprimer mon respect et ma gratitude pour votre soutien et vos encouragements. Je vous dédie ce travail en remerciement pour l'amour et l'extraordinaire gentillesse que vous me témoignez au quotidien.

Que Dieu tout-puissant vous protège et vous accorde santé et bonheur.

A mes chers amis

Une pensée très spéciale envers nos collègues et nos amis pour leur soutien moral et leur esprit de groupe.

BENHAUCHE WAHIDA



DEDICACES

Je veux commencer par exprimer ma plus profonde gratitude à Dieu pour les bénédictions qu'il m'a accordées. Sans sa grâce ; je ne serais pas là

ou je suis aujourd'hui. Je suis vraiment humble et honoré d'avoir son amour et son soutien dans ma vie.

A ma chère mère Souad,

A mon cher père Ahmed

Aucun mot ne peut exprimer le niveau d'affection, d'appréciation, de respect et de gratitude que je ressens pour vous.

Vous avoir à mes côtés m'apporte toujours confiance et réconfort. Vous étiez toujours là pour me réconforter quand j'en avais besoin, vos conseils m'ont toujours conduit au succès.

Mes chers et adorables parents, que dieu vous accorde une longue vie de bonheur et une bonne santé.

A ma chère grand-mère

Pour ses prières et son affection qu'elle m'apporte.

A mes chers oncles

Abd el krime et Amar pour leur aide morale et pour leur présence constante en cas de besoin.

Je vous exprime ma profonde gratitude et mon respect.

A mes chères sœurs et A tous mes amis

Qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A toute ma grande famille

à mes professeurs qui m'ont orienté durant les années de formation

À tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

Merci d'être toujours là pour moi.

OTMANE IMENE



Liste de tableaux

Tableau 01 Caractéristiques des souches testées	7
Tableau 02 Matériaux utilisés dans cette étude	7
Tableau 03 : Résultats de l'aspect macro et microscopique de <i>S.thermophilus</i>	14
Tableau 04 Rendement en EPS de <i>S. thermophilus</i> en présence et absence de cholestérol	17
Tableau 05 Pourcentage de l'élimination du cholestérol par <i>S. thermophilus</i>	18

Liste de figures

Figure 01 : Etapes essentielles du protocole expérimental.....	6
Figure 02 : Détermination du biofilm de <i>S. thermophilus</i> par le test rouge Congo (A) et la méthode du CV (B).....	15
Figure 03 : Capacité de formation de biofilm en fonction du temps	16

Sommaire

Remerciements.....	II
DEDICACES	III
Liste de tableaux.....	VI
Liste de figures.....	VII

Introduction

Introduction.....	2
-------------------	---

Matériel et Méthodes

1. Objectif de travail.....	5
2. Lieu et période de travail	5
3. Protocole expérimental	6
3. Matériel utilisés	7
Souches lactiques.....	7
Appareillage, verreries et produits chimiques.....	7
4Méthodes et démarche expérimentale	8
Vérification de la pureté de la souche.....	8
Préparation des aliquotes.....	8
Détermination de la formation de biofilm.....	9
Test du rouge Congo.....	9
Test réalisé en tube	9
5. Production totale d'EPS.....	9
Croissance et production d'EPS en présence de cholestérol.....	10
Dosage des EPS	10
6. Elimination du cholestérol	10
Effet anticholesterolémique.....	10
Élimination du cholestérol par les cellules traitées par la chaleur	11
7. Analyses statistiques.....	11

Résultats & Discussion

1.	Vérification de la pureté de la souche.....	14
2.	Détermination de la formation de biofilm	14
3.	Production totale d'EPS en présence et en absence de cholestérol	16
4.	Élimination du cholestérol	17
	Effet anticholestérolémique.....	17
5.	Élimination du cholestérol par les cellules traitées par la chaleur.....	18

Conclusion

Conclusion	21
------------------	----

Liste de références

Liste des références

Résumé

ANNEXES



Introduction

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques (BALs) forment un groupe de micro-organismes extrêmement hétérogène capable de produire de l'acide lactique comme élément métabolique principal. Les BALs appartiennent à différents genres et espèces et sont considérées comme étant non toxiques (**Michel Desmazeaud., 1996**). Ainsi, la flore lactique colonise de nombreux aliments tels que les produits laitiers, les viandes, les légumes et les céréales, et forme en partie la flore intestinale et vaginale de l'homme et des animaux (**Stiles et al., 1997**). Grâce à leur performances technologiques, les espèces lactiques sont d'un usage important dans les processus de fermentation dont le but est de préserver les aliments. En conséquence, leur durée de vie est prolongée et certaines de leurs propriétés gustatives et texturantes sont conservées et ou améliorées. Ces aliments constituent souvent une identité culturelle (**Corrieu et al ., 2008**). Certaines espèces du groupe lactique ont le statut probiotique, en particulier *Lactobacillus spp.* et *Bifidobacterium spp.* c'est des résidents importants du tractus gastro-intestinal souvent exploitées pour leurs effets santé (**Lee et al., 2009**).

Streptococcus thermophilus est l'une des espèces lactiques les plus utilisées dans les processus de transformation laitière (**Rachel., 2021**). En raison de son importance commerciale, cette bactérie a été bien caractérisée en termes de propriétés physiologiques, écologiques et métaboliques (**Hutkins, 2014**). En technologie alimentaire, cette espèce est d'une grande importance en raison de sa capacité à produire de l'acide folique et son pouvoir acidifiant. D'autres parts, sa capacité à former le biofilm s'est avérée aussi un trait important dans sa sélection comme culture starter (**Boubakeur et al., 2022**).

Le biofilm constitue le mode de vie préféré des bactéries (**Watnick et al ., 2000**). Il est décrit par (**Bjarnsholt .,2013**) comme étant une communauté de microorganismes qui adhèrent les uns aux autres et/ou à des surfaces au sein d'une matrice adhésive et protectrice. La production d'exopolysaccharides (EPS) est fortement liée à la formation de biofilm, ainsi toute perturbation des gènes impliqués dans la production de ces biopolymères peut empêcher la formation des biofilms matures (**Watnick et al., 1999**). Les bactéries lactiques ont la faculté de produire des EPSs qui sont ensuite excrétés dans le milieu, comme c'est le cas dans le lait. Ces polymères ne servent pas de source d'énergie pour les micro-organismes producteurs. Outre leurs fonctions écologiques et leur importance technologique, ils sont aussi dotés de vertus thérapeutiques (**Tok et Aslim., 2010**). Les EPSs sont des macromolécules organiques à longues chaînes linéaires ou ramifiées renfermant des unités de sucre à des proportions différentes, principalement du glucose, du galactose, et du rhamnose. Ces

Introduction

biopolymères sont d'une valeur alimentaire, médicamenteuse et rhéologique (**Temzi et al., 2021**). Ils sont considérés comme agents naturels possédant d'innombrables effets santé, on leur attribue le rôle d'antioxydant, anticancéreux, antidiabétique, immunomodulateur, antibactérien (**Al Kassaa et al., 2014; Riaz Rajoka et al., 2020**). Autres propriétés fonctionnelles sont associées aux EPSs des BALs dont la réduction et ou l'élimination du cholestérol (**Nataraj et al., 2020; Riaz Rajoka et al., 2020**).

Le cholestérol est un acide gras, parmi les lipides essentiels au fonctionnement normal de l'organisme. Au niveau sanguin, le cholestérol est transporté sous sa forme liée ou estérifiée par des lipoprotéines. Il s'agit d'un substrat essentiel pour la synthèse des hormones stéroïdes dans les glandes endocrines ou de la vitamine D dans la peau (**Amrouche et al., 2018**). Selon la **Fondation des maladies du cœur et de l'AVC (2016, 2018, 2019)**, l'hypercholestérolémie est considérée comme principal facteur de risque des maladies coronariennes, c'est la première cause de mortalité dans de nombreux pays du monde du fait que la progression fulgurante de cette maladie ne cesse de s'accélérer (**Townsend et al., 2016**). Il a été prouvé que les personnes atteintes d'hypercholestérolémie, sont plus suspectes aux risques de crise cardiaque (trois fois) que les personnes dont le bilan lipidique est normal (**Kumar et al., 2012**).

Les médicaments permettant de traiter ce déséquilibre lipidique sont omniprésents sur le marché, cependant, avec des effets indésirables, suscitant des inquiétudes quant à une utilisation à long terme (**Korc et al., 2018**). D'autres part, de nombreuses recherches ont indiqué la possibilité de réduire le taux de cholestérol sanguin grâce à la consommation des produits laitiers (**Tok et Aslim., 2010**), cela paraît intéressant puisqu'une réduction de 1 % peut faire baisser le risque de maladie coronarienne de 2 à 3 % (**Manson et al., 1992**). Il convient ainsi de mettre l'accent sur la recherche de produits naturels d'origine végétale ou microbienne susceptibles de réduire sensiblement le taux de cholestérol sérique.

Nos études in vitro s'inscrivent dans ce cadre. L'objectif est de tester la capacité de souches de lactate techniquement intéressantes à réduire et/ou éliminer le cholestérol.

Le présent manuscrit comporte une introduction générale montrant l'importance et l'application des BALs dans les différents domaines ou on expose également l'objectif, la problématique et l'hypothèse proposée. Le chapitre matériel et méthodes est consacré à la présentation des étapes de la démarche expérimentale. Dans un troisième chapitre, les résultats et leur discussion sont illustrés. La dernière partie du manuscrit est consacrée à la présentation du Business Model Canvas (BMC).



Matériel et Méthodes

1. Objectif de travail

Cette étude s'inscrit dans le cadre de projet start-up, elle a pour objectif d'étudier une des propriétés santé d'un exopolysaccharide produit par une souche lactique à statut probiotique : *Streptococcus thermophilus*. En effet, l'étude envisage l'évaluation de son pouvoir anticholesterolemique. Ainsi, les étapes de la démarche expérimentale aboutissant à cet objectif sont décrites ci-dessous :

- Sélection de souches à fort potentiel sécrétoire d'exopolysaccharides,
- Estimation quantitative et qualitative du biofilm formé
- Production d'EPS dans des conditions optimales
- Evaluation du pouvoir d'assimilation du cholestérol par la cellule bactérienne
- Evaluation du pouvoir anticholesterolemique de l'EPS produit

2. Lieu et période de travail

Cette étude a été accomplie sur une période de cinq semaines (allant de 29 Janvier au 05 Mars) au sein du laboratoire de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn-Khaldoun de Tiaret.

3. Protocole expérimental

L'ensemble des étapes du protocole expérimental est illustré dans la figure N01.

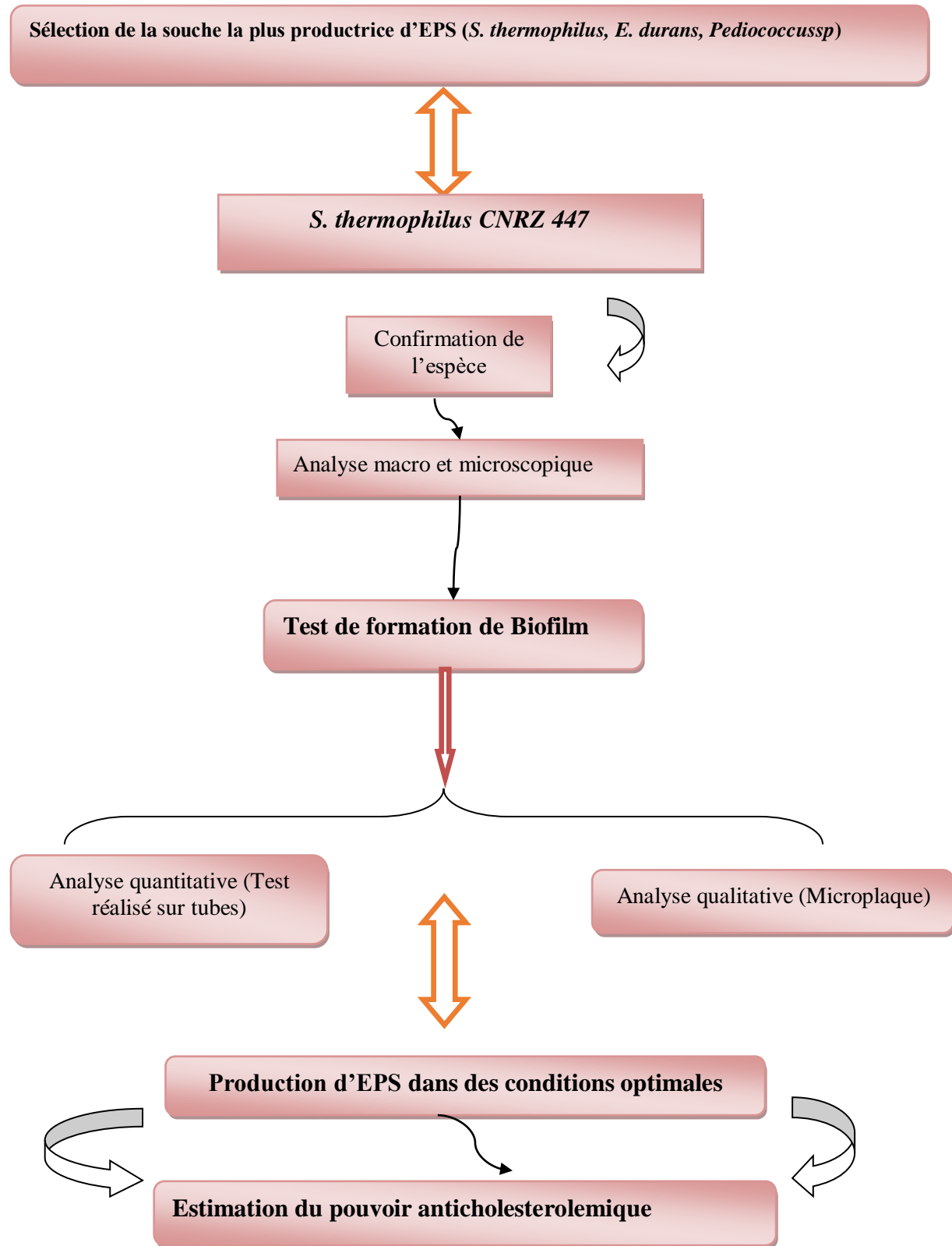


Figure N°01 Etapes essentielles du protocole expérimental

Matériel et Méthodes

3. Matériel utilisé

3.1 Souches lactiques

Trois espèces du groupe lactique ont été testées pour leur production d'EPS dont *Streptococcus thermophilus* CNRZ447, *Enterococcus durans* et *Pediococcus spp.* Les caractéristiques de ces dernières sont illustrées dans le tableau ci-dessous.

Tableau N01 : Caractéristiques des souches testées

Souches lactiques	Gram	Provenance et origine	Numéro
<i>S. thermophilus</i>	+	France / yaourt	CNRZ 447
<i>Pediococcus spp</i>	+	Turquie	
<i>E. durans</i>	+	Blé fermenté	

3.2 Appareillage, verreries et produits chimiques

Les matériaux utilisés dans cette étude sont classés dans le tableau N°01.

Appareillage	Verreries et consommables	Produits chimiques et colorants	Milieux de cultures	Autres
- Autoclave	- Bêchers	-Acide acétique (CH ₃ COOH)	- MRS (liquide)	-Barreaux
- Agitateur magnétique	- Eprouvettes	-Acide Sulfurique (H ₂ SO ₄)	- MRS (gélose)	Magnétique
- Bain marie	Graduées	-Méthanol (CH ₃ OH)	- M 17 (liquide)	-Bec Bunsen
- Balance	- Erlenmeyers	-Violet de gentiane	- M 17 (gélose)	-Embouts
- Centrifugeuse	- Lames	-Chlorure de sodium (Na Cl)	-Milieu hypersaccharosé	- Micro-filtre
- Etuve	- Pipettes graduées	-HCl		- Gants
- PH-mètre	- Pipettes pasteur	-Saccharose		- Micropipettes
- Plaque chauffante	- Tubes à essai			-Porte tubes

Matériel et Méthodes

- Spectrophotomètre UV-Visible -Chronomètre -Congélateur -Microscope optique -Vortex	-Boites Pétrie - Cuves - Spatule -Verre de montre - Flacon - Pissette	-Tryptone -Phénol - Cristal Violet à 1% - Ethanol à 96% Colorants de Gram - Lactose - Rouge Congo - Phosphate buffer saline	- Masque
---	--	--	----------

4. Méthodes et démarche expérimentale

4.1 Vérification de la pureté de la souche

La préparation des aliquotes a été précédée par une étape de vérification de la pureté des souches. Après avoir cultivé la souche sur milieu M17 plusieurs fois, une observation microscopique (après coloration de Gram) et macroscopique ont été réalisés pour confirmer l'espèce.

NB/ *S. thermophilus* était la seule souche retenue pour les différentes analyses. Toutefois, l'espèce *Enterococcus durans* et *Pediococcus spp* ont été écartées à cause les contaminations subites lors des manipulations, la difficulté de leur purification (non disponibilité de milieux de culture sélectifs et certains facteurs de croissances) et la limite de temps accordée.

4.1.1 Préparation des aliquotes

La souche retenue pour les différents tests de cette étude été conservée pour plus d'une année ce qui a nécessité une étape de revivification en inoculant le bouillon M17 par un volume de la suspension et en réalisant des ensemencements en stries sur gélose M17. Après incubation à 37°C pendant 24H, des observations

Matériel et Méthodes

macroscopiques (Aspect des colonies, leur couleur et leur forme) ; et microscopiques (coloration de Gram) ont été réalisées pour confirmer la pureté de l'espèce étudiée. Les aliquotes ont été préparés et conservés au froid et avant chaque test les suspensions sont ajustées à l'échelle 0.5 Mac Farland, $D0 = 0.08-0.13$

4.2 Détermination de la formation de biofilm

Pour révéler le phénotype biofilm⁺ de la souche sélectionnée, trois méthodes ont été adoptées : Test Tube et la méthode d'essai sur microplaque établies les deux par Cristensen, et la méthode de rouge Congo décrite par (Freeman et al., 1989); Furtuna et al., 2018).

4.2.1 Test du rouge Congo

Le milieu M17 a été préparé et autoclavé à 121°C pendant 15 min, puis a été supplémenté de l'indicateur rouge Congo (0.01g). Les boîtes coulées ont été inoculées et incubées pendant 24 H à 37 °C. Un résultat positif se traduit par des colonies de couleur noire, tandis qu'un résultat négatif se traduit par une coloration rose des colonies.

4.2.2 Test réalisé en tube

Une suspension bactérienne ajustée à 10^8 cellules/ ml était réparti dans des tubes contenant le milieu M17. Les tubes ont été ensuite incubés à 42°C pendant 24H et 48H. Chaque tube a été soigneusement vidé de la culture bactérienne et rincé 03 fois avec de l'eau distillée et ont été colorés par le cristal violet 0,1%(m/v), après incubation de 15min, ; ils ont été rincés pour se débarrasser de l'excès de colorant et ont été laissés pour se sécher. L'acide acétique à 30% a été utilisé pour détacher les cellules attachées au paroi des tubes et la DO a été prise à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Khadem et al.,2021).

5. Production totale d'EPS

La production d'EPS de *S. thermophilus* a été réalisée dans des conditions optimales (Khadem et al., 2020), et selon les étapes décrites par (Ricciardi et al., 2002). Brièvement, après thermisation dans un bain marie à 80°C pendant 15 min, les tubes contenant la culture de *S. thermophilus* ont été centrifugés à 5000 g

Matériel et Méthodes

pendant 15 min. Trois volumes d'éthanol (conservé au froid) ont été ajoutés dans le but de précipiter l'EPS. Le mélange a été centrifugé à -4°C , 12000g, 20 min, et le culot a été précipité une seconde fois en ajoutant un volume d'éthanol. L'EPS en culot a été récupéré après centrifugation dans les mêmes conditions et a été solubilisé dans l'eau distillée stérile. Il a été conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

5.1 Production d'EPS en présence de cholestérol

Le comportement des cellules en présence du cholestérol et leur aptitude en terme de production d'EPS a été conduite en adoptant le protocole de **Tok et Aslim (2010)**; brièvement le milieu hypersaccharosé a été inoculé par une suspension de *S. thermophilus* ajustée à 10^8 cellules /ml ; ce milieu a été supplémenté par le cholestérol à raison de 100 μg . Les cultures en présence de cholestérol ont été incubées. Afin d'étudier l'effet du cholestérol sur la croissance, les surnageants des suspensions incubées en présence de cholestérol ont été prise à 578 nm, ainsi, pour évaluer le rendement en EPS en présence de cholestérol, les cultures ont été traitées comme décrit dans la section (5).

5.2 Dosage des EPS

L'estimation du taux d'EPS produits a été faite selon le protocole de (**Dubois et al .,1956**). Brièvement un volume de 0.5ml de la solution mère d'EPS ou de ses dilutions a été introduit dans un tube, puis 0.5 ml de phénol et 2.5ml d'acide sulfurique ont été ajouté, le mélange a été agité et la DO a été prise à 490nm contre un blanc.

6. Elimination du cholestérol

6.1 Effet anticholesterolemique

Le protocole de **Tok et Aslim (2010)** ; **Kimoto et al (2002)** a été adopté pour étudier la capacité de la cellule bactérienne et de son EPS à éliminer le cholestérol. Une culture de *Streptococcus thermophilus* CNRZ447 a été préparée en inoculant le bouillon M17 supplémenté de sels biliaires (3 mg/ml) et cholestérol (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Elle a été incubée à 42°C pendant 18 H et a ensuite été centrifugée à 10 000 g pendant 20 min à 1°C . La DO du surnageant a été prise à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la part de

cholestérol éliminée a été estimée en soustrayant la quantité de cholestérol du surnageant de celle du contrôle (non inoculé).

6.2 Élimination du cholestérol par les cellules traitées par la chaleur

Le protocole de (Kimoto et al., 2002) a été adopté pour ce test. Une culture jeune a été préparée dans un bouillon M17, cette suspension a été centrifugée à 1800 g, pendant 15 min, elle a ensuite été rincée et le culot a été redissout dans 10 ml d'eau distillée. Ce mélange a subi un traitement thermique. Les cellules détruites par la chaleur ont été mises en suspension dans un bouillon M17 contenant des sels biliaires (3 mg/ml) et du cholestérol (100 µg/ml). Le processus d'incubation et de centrifugation était le même comme ci-dessus. Un dosage du cholestérol a été effectué dans le surnageant en lisant la DO à 517 nm.

7. Analyses statistiques

Les tests réalisés dans cette étude étaient répétés trois fois, les valeurs sont montrées en moyenne \pm écart type. L'analyse statistique a été faite en utilisant le logiciel SPSS 25.

Matériel et Méthodes




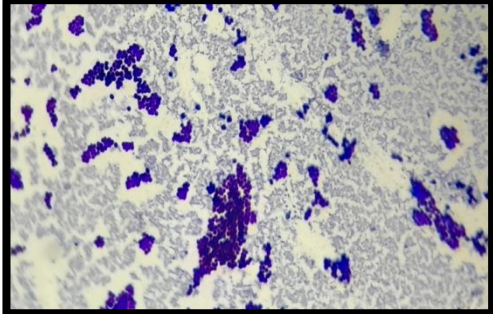
Résultats & Discussion

Résultats & Discussion

1. Vérification de la pureté de la souche

L'observation micro (après coloration de Gram) et macroscopique montrées dans le tableau ci-dessous confirment les deux la pureté de l'espèce étudiée.

Tableau N03 : Résultats de l'aspect macro et microscopique de *S.thermophilus*

Aspect des colonies sur milieu M17	Aspect microscopique (Coloration de Gram)
<p>Colonies de couleur crème à aspect muqueux, surface bombée lisse</p> 	<p>Coques regroupés en chainettes, en amas Gram+</p> 

2. Détermination de la formation de biofilm

Les photos montrées dans la figure N 01 illustrent le résultat de la capacité de *S. thermophilus* à former le biofilm sur la gélose rouge Congo (GRC) et sur tubes par la méthode du cristal violet. Sur GRC les colonies apparaissent en noir, selon **Furtuna et al., (2018)**, les microorganismes ont tendance à vivre en communauté ou population ou les cellules sont en mode sessile, on parle ici de la notion de biofilm.

Résultats & Discussion

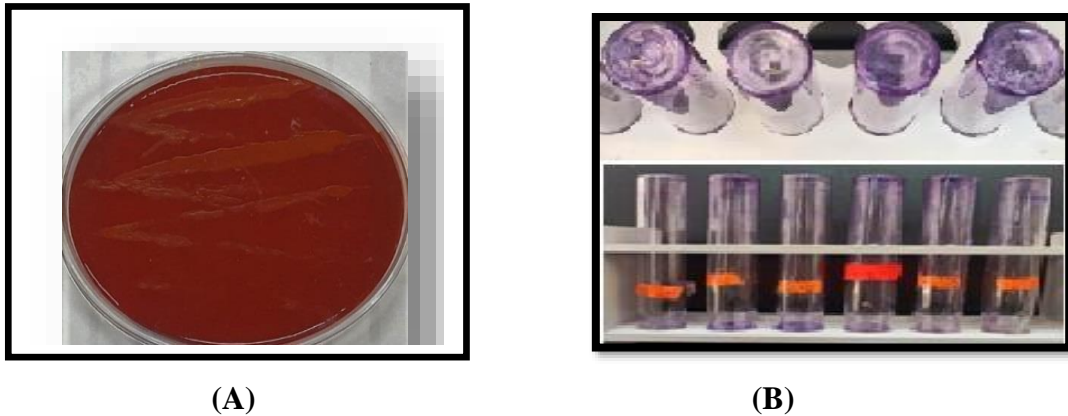


Figure N02 Détermination du biofilm de *S. thermophilus* par le test rouge Congo (A) et la méthode du CV (B)

Mathur et al., (2006) ; Ait Meddour et al., (2014) indiquaient que la couleur noire des colonies sur gélose rouge Congo détermine une forte production de slime¹. Ils signalaient aussi dans leur travail portant sur la détermination de biofilm en testant trois méthodes que le test rouge Congo n'est pas fort en termes de fiabilité.

Les espèces du groupe lactiques sont capable de former le biofilm. Ainsi, cette capacité peut être variable d'une souche à l'autre. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus durans* forment un biofilm consistant (**Zhao et al., 2004**).

La formation de biofilm formée par *S. thermophilus* a été affectée par le temps avec une variation très significative ($p < 0.007$), en effet la quantité de biofilm formé après 48h d'incubation est deux fois plus importante qu'après 24h d'incubation (0.3 : 24H VS 0.7 : 48H).

¹ Slime : Production d'une couche mince de nature polysaccharidique (**O'Gara et Hamphreys, 2001**)

Résultats & Discussion

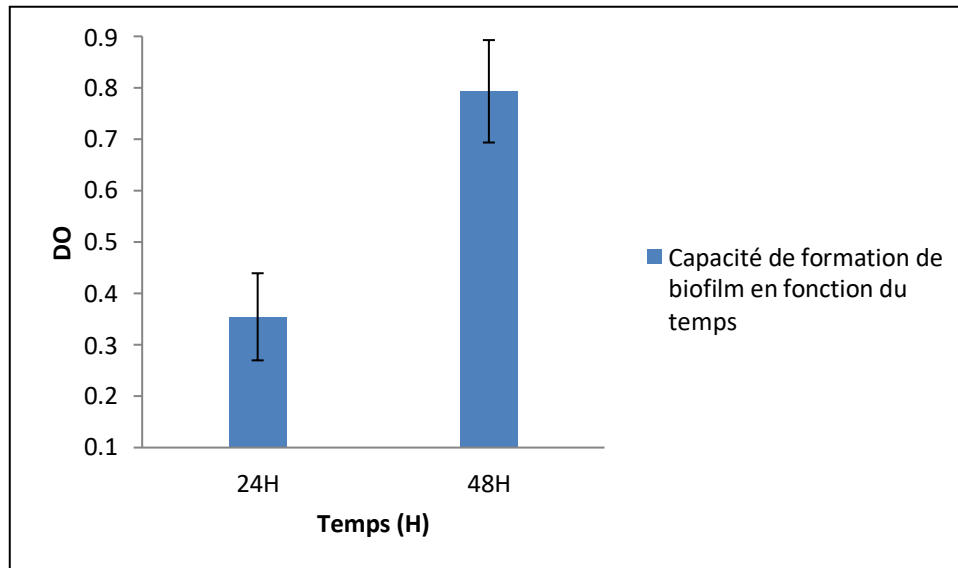


Figure 03 ; Capacité de formation de biofilm en fonction du temps

D'autre part, selon les travaux de **Khadem et al (2020)** ; **Boubakeur et al (2021)**, la capacité de *S. thermophilus* à former un biofilm est considérée comme moyenne (DO comprise entre 0.2 et 0.4).

Cette aptitude est expliquée d'une part par la forte capacité d'adhésion des bactéries et d'autre part par leur préférence de vivre en mode sessile ce qui les rend plus résistantes aux conditions environnementales. En effet, cette aptitude offre aux microorganismes certaines performances technologiques désirées dont la résistance aux agents antimicrobiens, aux différentes opérations de production, l'amélioration du potentiel probiotique et du rendement en certains métabolites (**Flemming et al., 2010**) et est exploitée beaucoup en agroalimentaire pour la préservation des aliments (**Zhao et al., 2004**).

3. Production totale d'EPS en présence et en absence de cholestérol

Le tableau N 04 illustre les rendements en EPS de la souche testée en présence et absence de cholestérol. Il est remarquable que dans un milieu supplémenté en cholestérol (100µg/mL, la production d'EPS a été fortement réduite, ainsi la valeur enregistrée était de l'ordre de $259 \pm 0,01$ mg Eq de glucose/ L contre $22 \pm 0,01$ mg Eq de glucose/ L. Il est bien évident qu'à une telle concentration la production a été négativement affectée ($P < 0.001$).

Résultats & Discussion

Tableau N 04: Rendement en EPS de *S. thermophilus* en présence et absence de cholestérol

	Rendement en EPS mg/ml
<i>S.thermophilus</i> sans cholestérol	259± 0,0160
<i>S.thermophilus</i> + 100 µg /ml	22±0 ,010

La production d' EPS des espèces de *S.thermophilus* varie de 1-2g/L (**Khadem et al., 2022**). **Tok & Aslim (2010)**, ont rapporté que cette production est souche dépendante, et que parmi plusieurs souches lactiques, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus B3* avait le meilleur rendement estimé à 211 mg/ L

Zhang et al., (2011) ont ajouté que l'EPS de *S.thermophilus* est de nature visqueuse ce qui explique son application potentielle pour améliorer les propriétés physiques des produits.

Selon le tableau ci-dessous, il est bien évident que dans un milieu contenant le cholestérol à 100 µg/ml, le rendement en EPS a été estimé à 22± 0,01 mg Eq de glucose/ L. est reste plus faible qu'en absence de cholestérol. L'effet du cholestérol sur la production d'EPS a été rapporté dans plusieurs travaux (**Nataraj et al., 2020 ; Riaz Rajoka et al., 2020**). Contrairement à ce qu'on abstenu, Tok et Aslim (2010) ont signalé qu'a la même concentration le rendement a été positivement affecté. Ils supposent ainsi que le cholestérol stimule la production d'EPS.

4. Elimination du cholestérol

4.1 Effet anticholesterolémique

Sur le tableau N05 sont représentés les pourcentages d'élimination du cholestérol par *S. thermophilus* ; il est bien remarquable que la souche soit dotée d'une forte capacité d'élimination du cholestérol estimée à 85±0,61%.

Résultats & Discussion

Tableau N05 Pourcentages d'élimination du cholestérol par *S. thermophilus*

	Elimination (%)
Milieu inoculé	85,366±0,619
Milieu non inoculé	0 (le cholestérol était à100%)

Ces résultats sont similaires à ceux de **Gawand et al., (2021)** qui ont enregistré une valeur similaire pour *L. fermentum* NCDC400 et proche pour *S. thermophilus* (75%). **Tok & Aslim (2010)** ont rapporté que les espèces lactiques les plus productrices d'EPS sont celles qui éliminent plus le cholestérol et que cette capacité diminue en fonction du temps d'incubation, elle est plus forte lorsque les cellules sont en phase exponentielle. L'élimination du cholestérol pour les souches testées dans leur étude pourrait être attribuée à l'EPS produit. De même **Abd El Ghany et al., (2016)** ont montré que l'activité hypocholestérolémiant du β - glucane est dose-dépendante et varie de 12,8% à 28,2% pour une concentration de 100 à 400 $\mu\text{g/mL}$.

5. Élimination du cholestérol par les cellules traitées par la chaleur

L'élimination du cholestérol par les cellules tuées par la chaleur montre une réduction considérable, estimée à 33%, toutefois elle reste moins importante que celle des cellules en croissance. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Tok & Aslim (2010)** qui ont rapporté que le traitement thermique affectait négativement et significativement le potentiel de réduction de cholestérol, et que le pourcentage de réduction enregistré était au voisinage de 10%.

Résultats & Discussion

Comme les cellules tuées sont encore capables d'éliminer le cholestérol du milieu, ceci confirme qu'une partie du cholestérol est restée attachée aux cellules. Selon les résultats montrés ci-dessus, on remarque que l'état de la cellule affecte significativement son comportement à réduire le cholestérol présent dans le milieu, l'effet est très hautement significative ($P < 0.001$).



Conclusion

Conclusion

Conclusion

La présente étude a permis la mise au point d'un produit issue du métabolisme bactérien et ayant un effet bénéfique sur la santé. L'étude a révélé que *S. thermophilus*447 CNRZ dispose n'ont pas seulement de propriétés probiotiques (résultats publiés) mais aussi de qualités appréciables en ce qui concerne l'activité hypocholestérolémiante. En effet la réduction du cholestérol en phase de croissance très considérable, de l'ordre de 85% , ainsi cette capacité persistait toujours lorsque les cellules sont traitées thermiquement (33%) .

La combinaison d'une culture probiotique pouvant réduire le cholestérol et d'une souche ayant une grande capacité de production d'EPS peut servir à la préparation d'un produit laitier fermenté ayant un effet positif sur la santé des consommateurs. Cela offre de nombreuses opportunités en termes d'utilisation de cette espèce (ou d'autres espèces lactiques), en particulier en industrie laitière ou elle pourrait par exemple servir à la production de fromage, le lait fermenté ou un dessert laitier à teneur réduite en cholestérol avec des performances fonctionnelles intéressantes. Et puisque les consommateurs aujourd'hui sont de plus en plus conscients du lien existant entre l'alimentation et le bien-être, il devient maintenant fort important de plus mettre l'accent sur la recherche scientifique de produits alimentaires naturels à faible teneur en matières grasses et de produits susceptibles de réduire sensiblement le taux de cholestérol sérique avec des effets secondaires mineurs.

En effet, des amples études *in vivo* sont requises non seulement pour explorer les mécanismes de régulation de l'action hypocholestérolémiante des BALs, mais aussi afin de prévenir des réactions négatives possibles.



Liste des références

Liste des références

A

- **Abd El Ghany, K . , Hamouda, R. A. , Mahrous, H. , Abd Elhafez, E. , Ahmed, F. A. H. , & Hamza, H. A. (2016).** Description of isolated LAB producing beta-glucan from Egyptian sources and evaluation of its therapeutic effect. *International Journal of Pharmacology*, 12 (8), 801–811 .
- **Al Kassaa , I . , Hober , D. , Hamze , M . , ChihibNE, and DriderD.(2014).** Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins.Probiotics Antimicrob.Proteins 6.177-185.
- **Amrouche,I.,Bastardet,M.(2018).**Rédigé par des Experts Ooreka. <http://cholesterol.ooreka.fr/comprendre/accident-cardiovasculaire>.
- **Azi ,A. Bensakhreya, A .F., Temzi ,S.(2021) .**Rôle des exopolysaccharides bactériens dans le domaine agroalimentaire.

B

- **Bjarnsholt, T.(2013).**Role of bacterial biofilms in chronic infections.APMIS by Wiley Backwell.P1-51.
- **Boubakeur ,B. Soungalo, D .M. ,Khadem, H. Segda, R.Ajmal ,S. M. ,Savadogo, A. (2022).** Effets antimicrobiens,antibiofilm et probiofilm de l'acide gallique sur le biofilm dépendant et indépendant de l'exopolysaccharide de souches modèles streptococcus thermophilus CNRZ 447 et Staphylococcus aureus ATCC 43300.

C

- **competitive-exclusion microorganisms.** Appl Environ Microbiol 2004;70(7):3996–4003.

D

- **Desmazeud ,M. (1996).**Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité .Cahiers agricultures 5 (5) ,331-343 (1) .
- **Dubois, M. Gilles ,K.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956).**Colorimetric method for determination of sugars and related.substances. Chemistry,28(3),350-356.

Liste des références

F

- **Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- **Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada, 2016, 2018,2019.** Prendre en charge son taux de cholestérol. *Food& function* 9 (6),3057-3068,2018.
- **Furtuna, D. K., Debora, K., & Wasito, E. B. (2018).** Comparison of microbiological examination by test tube and congo red agar methods to detect biofilm production on clinical isolates. *Folia Medica Indonesiana*, 54(1), 22-28.

G

- **Gasser ,C.(2022).**Métabolisme carboné chez streptococcies thermophilus : régulation et diversité au sein de l'espèce .
- **Gawande, K ., Kolhekar, M ., Kumari ,M ., Kapila, S. , Sharma, P. , Ali ,S.A , Behare ,P.V.(2021).** Lactic acid bacteria based purified exopolysaccharide showed viscofying and hypercholesterolemic capabilities. *Food Hydrocolloids for Health* 1 (2021) 100042.
- **Georges, C, . François-Marie, L. (2008)** .Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.

H

- **Holst, O, . Nilsson, L, . Öste, R, . & Andersson , K. E. (2012).** Effects of *Pediococcusparvulus* 2.6 and its exopolysaccharide on plasma cholesterol levels and inflammatory markers in mice. *AMB Express*, 2 (1), 66 .
- **Hutkins, R., Goh, Y.J. (2014).** Streptococcus: *Streptococcus thermophilus* .*Encyclopaedia of Food Microbiology: Second Edition*,554-559.

I

- **Iranmanesh,M., Ezzatpanah,H., Mojgani,N.(2014).** Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT - Food Science and Technology* 58 (2014) 355-359.

K

Liste des références

- **Khadem, H., Meddah, T.A., Soungalo, D.M., Boubakeur, B. (2020).** Ultrasound conditioning of *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447: growth, biofilm formation, exopolysaccharide production, and cell membrane permeability. vol. 101 (2) C pp. 159–165 C 2020.
- **Kimoto, H., Ohmomo S., Okamoto T. (2002)** Cholesterol removal from media by *lactococci*. *J Dairy Sci* **85**: 3182–8.
- **Korcz E., Kerényi Z., Varga L. (2018).** Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria :potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects.
- **Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A & Yadav H., (2012).** Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*.

L

- **Lee, D. K., Jang, S., Baek, E. H., Kim, M. J., Lee, K. S., Shin, H. S., ... & Ha, N. J. (2009).** Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids in Health and Disease*, 8(1), 1-8

M

- **Manson, J.E., Nathan, D.M., Krolewski, A.S., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Hennekens, C.H. (1992).** A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. *JAMA*. 1992 Jul 1;268(1):63-7. PMID: 1608115.
- **Mizuno, H., Tomotsune, K., Aminul Islam, M.D., Funabashi, R., Albarracin, L., Ikeda-Ohtsubo, W., Aso, H., Takahashi, H., Kimura, K., Villena, J., Sasaki, Y and Kitazawa, H. (2020).** Exopolysaccharides From *Streptococcus thermophilus* ST538 Modulate the Antiviral Innate Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes.
- **Morin-Pelchat, R., (2021).** étude des protéines non-structurales d'un phage infectant *streptococcus thermophilus*. Université Laval, Faculté des sciences et de génie.

N

Liste des références

- **Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V and Yadav, H.(2020).**Postbiotics-parabiotics :the new horizons in microbial biotherapy and functional foods.*Microb.Cell Fact.*19 :168.

P

- **Pluvinet, A .(2003);**Polymorphisme génétique du locus eps (exopolysaccharide) chez la bactérie lactique streptococcus thermophilus :évaluation rapide par remplacement de séquences .

R

- **Riaz ,R. M .S.,Mehwish, H. M.,Bansal, M.and Zhao, L.(2020).**Lactobacillus exopolysaccharides ;new perspectives on engineering strategies, physiochemical function, and immunomodulatory effects on host health.*Trends Food Sci ;Technol.*103.36-48.doi :10.1016/j.tifs.2020.06 .003.
- **Ridker ,P. M., Satterfield ,S., Hebert, P.,O'Connor, G .T., Buring, J .E & Hennekens ,C. H. (1992).** The primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 326, 1406-1416.

S

- **Sasikumar, K. , Vaikkath, D. K. , Devendra, L. , & Nampoothi, K. M. (2017).** An exopolysaccharide (EPS) from a *Limosilactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *BioresourceTechnology*, 241 , 1152–1156 .
- **Sørensen, M .,Rochfort, K. D .,Maye. S .,MacLeod ,G ., Brabazon , D., Loscher ,C and Freeland ,B. (2022).** Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food Helena.

T

- **Tok, E. , & Aslim, B. (2010).** Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and Immunology*, 54 (5), 257–264 .
- **Tsai, C. C. , Lin, P. P. , Hsieh, Y. M. , Zhang, Z. Y. , Wu, H. C. , & Huang, C. C. (2014).** Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo* . *The Scientific World Journal*, 2014 .

W

Liste des références

- **Watnick ,P ., Kolter, R. (2000).**Biofilm,city of microbes.Journal of bacteriology.P2675-2679.
- **Watnick ,P. I and Kolter ,R.(1999).**Steps in the development of a vibrio cholerae el Tor biofilm.Mol.Microbiol,34,586-595.doi :10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x.
- **Welman, A.D.,Maddox, I.S. (2003) .**Exopolysaccharides from lactic acid bacteria :perspectives and challengs.Trends Biotechnol 21:269-274.

Y

- **Yusuf, D. , Nuraida, L. , Dewanti-Hariyadi, R. , & Hunaefi, D. (2020).** In vitro characteri zation of lactic acid bacteria from Indonesian Kefir grains as probiotics with choles- terol-lowering effect. *Food Microbiology and Biotechnology*, 30 (5), 726–732

Z

- **Zhang, T .,Zhang ,C.H .,Li ,S.H .,Zhang, Y and Yang, Z. (2011).**Growth and exopolysaccharide production by Streptococcus thermophilus STI in skim milk.
- **Zhao, T.,Doyle, M.P., Zhao, P.** Control of Listeria monocytogenes in a biofilm by

A green scroll-like graphic with a white border and a white shadow. The scroll is unrolled, showing a light green interior. The text "Les annexes" is written in a black, italicized serif font in the center. The scroll has a white circular element at the top left and top right corners, suggesting it is a rolled-up document.

Les annexes

Annexes

Annexe I Composition des milieux de culture

[Milieu MRS]

Ingrédients	Quantité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Phosphate bi potassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.5g
Agar	15g

[Milieu M17]

Tryptone	2.5g
Peptone papainique de soja	5.0g
Peptone pepsique de viande	2.5g
Extrait de viande	5.0g
Extrait auto-lytique de levure	2.5g
Beta-Glycérophosphate de sodium	19.0g
Sulfate de magnésium	0.25g
Lactose	5.0g
Acide ascorbique	0.5g
Agar-agar bactériologique	15.0g
PH à 25°C	7.1± 0.2

Annexes

[Milieu hyper-saccharosé]

Tryptone	10g
Saccharose	50g
KH ₂ PO ₄	5g
pH	6.5

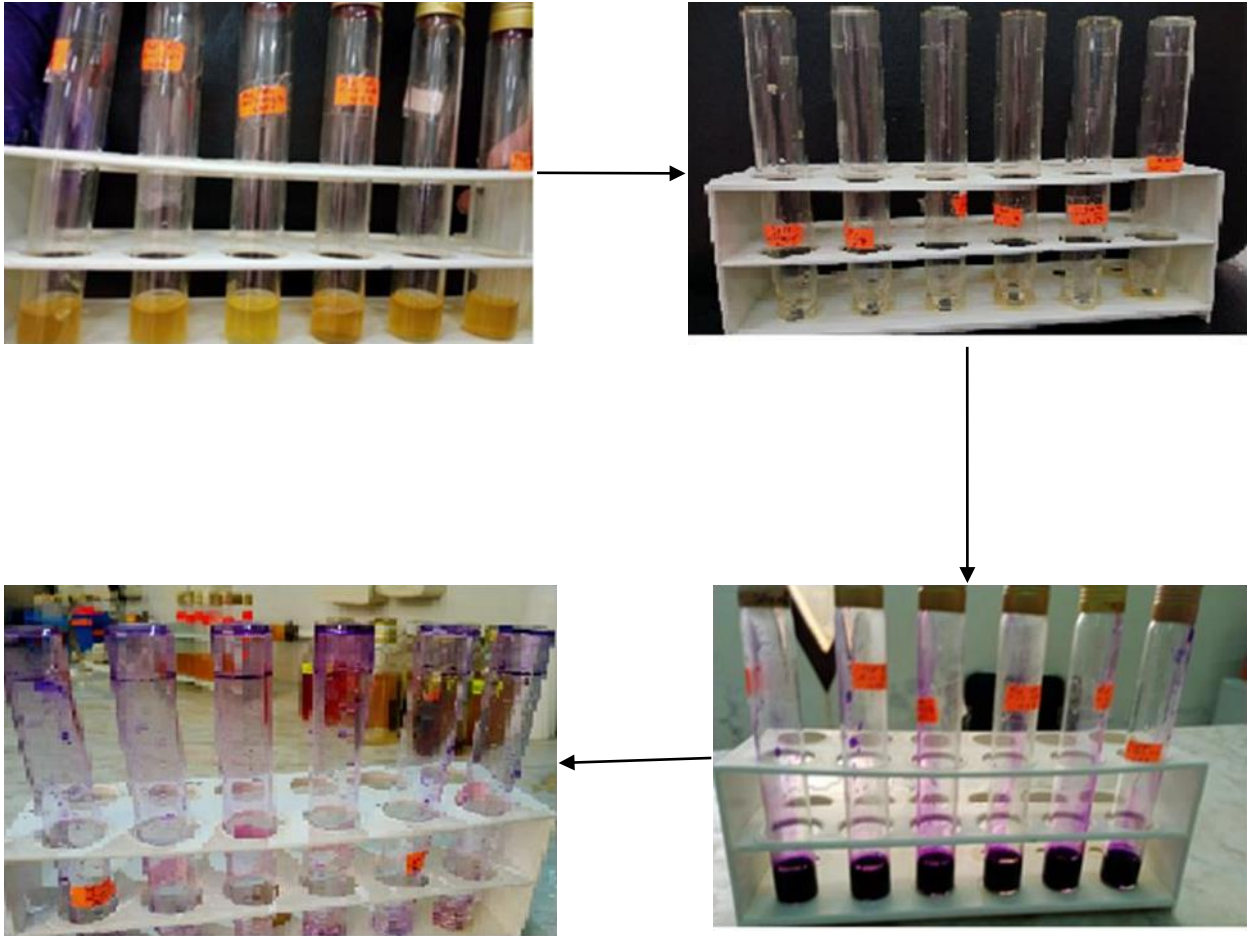
[Tampon PBS]

Chlorure de sodium	8g
Chlorure de potassium	0.2g
Phosphate disodique	1.15g
Phosphate (Monopotassique)	0.2g

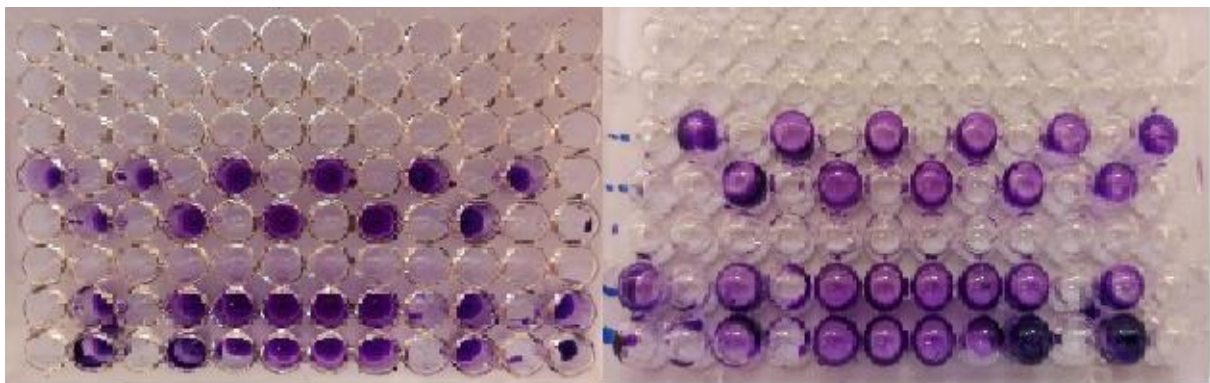
Autocaver les milieux à 121°C pendant 15min

Annexes

Annexe II: Photo des étapes de la coloration au cristal violet



a) Quantification du biofilm sessile dans les tubes



b)

Microplaque - *S. thermophilus*

Annexes

ANNEXE III: Appareillages



Incubateur



Centrifugeuse



Spectrophotomètre



Bain marie



Vortex



Balance analytique

Les annexes

Les annexes

Résumé

La majorité des exopolysaccharides (EPS) utilisés en industrie alimentaire proviennent de plantes, d'animaux et d'algues. Les EPS produits par les bactéries lactiques ont acquis une importance considérable depuis quelques années étant donné leur statut GRAS. Ils ne sont pas seulement importants pour l'industrie alimentaire, mais aussi en cosmétique et en pharmacologie.

La présente étude vise en premier lieu à étudier l'effet anticholestérolémique de l'EPS produit par *S. thermophilus* ainsi que la corrélation entre la production d'exopolysaccharides et taux d'élimination du cholestérol. Après une sélection des souches qui dépendait de leur capacité de production d'EPS et de former le biofilm, *S. thermophilus* a été retenue.

Il a été établi que *S. thermophilus* CNRZ 447 produisait une quantité considérable d'EPS 259 mg/l, était capable d'éliminer une quantité supérieure de cholestérol du milieu, estimé à 85%. En outre, la production d'exopolysaccharides a été évaluée en présence de cholestérol (100µg/ml), et a été négativement affectée. En effet, des concentrations inférieures devraient être testées. Le traitement thermique n'a pas affecté la capacité de la souche à éliminer le cholestérol, la réduction était à 33% cela indique l'implication des EPS dans le mécanisme de réduction du cholestérol.

D'après les résultats préliminaires, ces métabolites vedettes peuvent en induire des réponses physiologiques positives, notamment une baisse du taux de cholestérol

L'EPS peut constituer un traitement potentiel de l'hypercholestérolémie

Mots clés : Exopolysaccharides- GRAS- *S. thermophilus* CNRZ 447 - anticholestérolémique

ABSTRACT

The majority of exopolysaccharides (EPS) used in the food industry come from plants, animals and algae. EPS produced by lactic acid bacteria have acquired considerable importance in recent years, given their GRAS status. They are not only important in the food industry, but also in cosmetics and pharmacology.

The main aim of the present study was to investigate the anti-cholesterolemic effect of EPS produced by *S. thermophilus*, and the correlation between exopolysaccharide production and cholesterol elimination rates. *S. thermophilus* was selected on the basis of its ability to produce EPS and form biofilms.

It was found that *S. thermophilus* CNRZ 447 produced a considerable amount of EPS 259 mg/l, was able to remove a higher amount of cholesterol from the medium, estimated at 85%. In addition, exopolysaccharide production was evaluated in the presence of cholesterol (100µg/ml), and was negatively affected. Indeed, lower concentrations should be tested. Heat treatment did not affect the strain's ability to eliminate cholesterol, and the reduction was 33%, indicating the involvement of EPS in the cholesterol reduction mechanism.

Preliminary results suggest that these featured metabolites can induce positive physiological responses, including a reduction in cholesterol levels. EPS may be a potential treatment for hypercholesterolemia

Mots clés : Exopolysaccharides- GRAS- *S. thermophilus* CNRZ 447 - hypercholesterolemia

ملخص:

تعد النباتات و الحيوانات و الطحالب مصدر أساسي لمتعدد السكريات الخارجية المستخدمة في صناعة الأغذية . اكتسب متعدد السكريات الخارجية المنتج من طرف بكتيريا حمض اللاكتيك أهمية بالغة في السنوات الأخيرة نظرا لخاصية GRAS. فهو ليس مهم فقط لصناعة المواد الغذائية, و لكن أيضا في مستحضرات التجميل و علم الأدوية.

تهدف الدراسة الحالية أولا إلى دراسة قدرة السلالة البكتيرية *S.thermophilus* على تخفيض نسبة الكوليستيرول في الوسط. أثبتت هذه الدراسة قدرة *S.thermophilus* CNRZ447 على إنتاج كميات معتبرة من EPS 259 mg/ml, و كذا تخفيض نسبة معتبرة من الكوليستيرول الموجود في الوسط % 85 إضافة على ذلك, إنتاج متعدد السكريات الخارجية في وسط يحتوي على نسبة (100µg/ml) من الكوليستيرول عرف تناقصا هذا ما يستوجب اختبار تراكيز أقل . لم تؤثر المعالجة الحرارية على قدرة تخفيض الكوليستيرول لدى السلالة برغم من تناقصها .

تشير النتائج الأولية إلى أن هذا المنتج الأيضي المهم يمكنه تحفيز استجابات فسيولوجية ايجابية أهمها تخفيض نسبة الكوليستيرول. متعدد السكريات الخارجية EPS المنتج قد يكون علاجا محتملا لفرط كوليستيرول الدم.

الكلمات الدالة : عديدات السكاريد الخارجية- GRAS -*S.thermophilus* CNRZ 447- مضادات الكوليستيرول

Business Model Canevas



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret Faculté des Sciences de la Nature et de
la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Arrêté ministériel (1275) dans le cadre d'un diplôme STURT- UP

Nom de l'entreprise

CEPS



Nom commercial **CHOLEST-EPS**



Année universitaire : 2022 _ 2023

Fiche d'informations

À propos de l'équipe de supervision et de l'équipe de travail

1- Equipe d'encadrement

équipe de surveillance	
Spécialisation	Toxicologie et sécurité alimentaire
Spécialisation Microbiologie	: المشرف الرئيسي KHADEM HAFIDHA مساعد المشرف: MEZOUAR DJAMILA

2- Equipe de travail

L'université	Spécialisation	Projet de groupe
Université Ibn Khaldoun– Tiaret Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département des Sciences de la Nature et de la Vie	Toxicologie et sécurité alimentaire	MOUAZ IKRAM
		OTMAN IMAN
		BENHAOUCHE Wahida

PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DE BACTERIES LACTIQUES

I. Premier axe

Préparation d'un traitement naturel à base d'exopolysaccharides de bactéries lactiques pouvant réduire le cholestérol

Valeurs suggérées

a. Valeurs scientifiques

L'objectif majeur de l'approche adoptée est de fournir une alternative aux traitements existants, généralement de nature chimique. Elle vise à utiliser comme acteurs principaux un groupe de bactéries connues pour leur innocuité (GRAS), les bactéries lactiques, qui sont de plus en plus exploitées dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétologiques. Dans ce contexte, nous envisageons d'exploiter l'effet anticholestérolémique de l'EPS produit par *S. thermophilus*, un ferment lactique à potentiel probiotique.

Valeur personnalisée

Le métabolite envisagé pour son pouvoir anticholesterolemique est L'EPS,

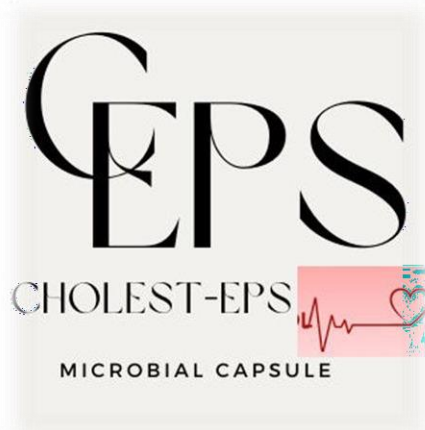
Ce polymère de nature visqueuse et de structure variable est produit avantageusement lorsque les conditions physicochimiques et organiques sont optimales. Il s'agit d'un bio métabolite considéré comme sûr. Après caractérisation de son profil chromatographique (identification avec précision de sa composition et sa structure) Il peut être lyophilisé dans des conditions optimale tout en gardant l'activité biologique, la stabilisé du produit. Il est par la suite reformulé sous forme de capsule facile a utilisé pour les personnes présentant un déséquilibre lipidique

a. Valeur de prix

Notre objectif est de proposer pour cette innovation un prix de vente compétitif et raisonnable, tenant compte des coûts impliqués et de la marge bénéficiaire, laquelle doit être raisonnable.

PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DE BACTERIES LACTIQUES

b. Valeur par conception



Le produit final possède un design appréciable, simplifiant son usage, et ce pour se démarquer de ses concurrents

2. Valeur de haute performance

Notre objectif est de proposer pour cette innovation un prix de vente compétitif et raisonnable, tenant compte des coûts impliqués et de la marge bénéficiaire, laquelle doit être raisonnable.

3. Valeur de haute performance

Le produit par sa nature (GRAS), son prix compétitif et ses effets indésirables minimes par rapport aux médicaments existants peut relever le défi de couvrir les premières années les besoins du marché national et par la suite s'orienter vers l'exportation.

Equipe de travail

L'équipe actuelle est composée de l'encadrante Mme KHADEM Hafidha, Mme BOUBAKEUR Badra et des étudiantes MOUAZ Ikram, BENOTMANE Imane, BENHAOUCHE Wahida, inscrites en master Toxicologie et sécurité alimentaire.

Les encadrants sont spécialisés en microbiologie et tout particulièrement dans l'utilisation des biomolécules d'origine microbienne comme alternatives innovantes permettant de générer des produits d'intérêt pharmaceutique et médical de haute performance

Objectifs du projet

Notre objectif est de préparer une formulation pharmaceutique ayant pour effet global la réduction du cholestérol

PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DE BACTERIES LACTIQUES

a. Chronologie de réalisation du projet :

La mission	Temps
Préparation et caractérisation de la souche productrice	7 jours
Collecte de matières premières 500 à 1000 litre	01 jour
Analyse physicochimique et microbiologique de la matière primaire	5 jours
Enrichissement de la matière primaire et préparation de la cuve de fermentation	01 jour
Remplissage de la cuve (fermenteur)	01 jour
Déroulement de la fermentation	05 jours
Récupération du produit « EPS »	03 jours
Purification du produit	03 jours
Contrôle des EPS récupéré	03 jours
Préparation du produit final « Sérum » et conditionnement (emballage)	02 jours
Total	27 jours

PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DE BACTERIES LACTIQUES

II. Deuxième axe

Aspects innovants

L'EPS des bactéries lactiques est considéré comme sûr ; ses effets santé sont innombrables et ont été prouvés in vivo. Les médicaments traitant les taux élevés du cholestérol existent sur le marché national et international ; ils sont à base de statines c'est-à-dire leur production est fondée sur des voies chimiques avec des effets négatifs et indésirables non négligeables et dangereux à long terme.

La présente biomolécule consiste en une alternative pouvant remplacer ou concurrencer les autres hypolipémiants existants.

La formulation aura donc le statut d'ingrédient naturel, d'autre part cette molécule est miraculeuse en termes d'effets santé qu'elle possède en parallèle (prébiotique) et qu'elle peut transmettre à l'hôte.

I. Troisième axe : Analyse stratégique du marché

III.1. Main d'œuvre

1. Collecte et entretien de la matière primaire

Le personnel chargé de la collecte et de l'analyse physicochimique et microbiologique de la matière primaire devrait être constitué de personnes qualifiées en microbiologie et biochimie.

Le personnel chargé du transport devrait être qualifié en termes de conduite et de responsabilité à l'égard du maintien de la qualité de la matière primaire.

III.2.2. Production et emballage

Le personnel chargé de la production des EPSs et de l'analyse physicochimique et microbiologique de produit fini devrait être constitué de personnes qualifiées en microbiologie industrielle. Le personnel chargé de l'emballage devrait être qualifié en chimie des matériaux.

III.3. Commercialisation

Le personnel chargé de la commercialisation du produit fini devrait être qualifié en marketing

Concurrent

Plusieurs laboratoires et organismes dominent le marché du médicament en Algérie; les EPSs sont exploités dans de nombreux secteurs à l'échelle mondiale, où ils sont utilisés comme texturants, gélifiants (agroalimentaire) ou en médecine et pharmacologie comme des ingrédients de préparations des crèmes, des compléments alimentaires, des agents antimicrobiens, antitumorales, immunomodulateurs et anticholestérols. Ces EPS sont utilisés individuellement ou en combinaison avec d'autres produits pour un large éventail de fonctions dans le domaine biomédical. Les diverses applications s'expliquent par le grand nombre de dérivés dont les propriétés utiles peuvent être contrôlées.

Nous envisageons ici la mise en œuvre d'une formulation faite d'ingrédients naturels et ce dans le but d'offrir aux consommateurs (clients) un produit final sûr et de qualité doté de plusieurs activités biologiques et avec moins d'effet indésirables vis-à-vis de la santé de l'homme et l'environnement, pouvant concurrencer d'autres produits sur le marché.

Concernant le prix en alignant notre stratégie sur celle de notre pays, en matière de développement socio- économique durable et de notre politique pharmaceutique nationale, nous visons un accroissement de capacité de production ainsi que l'élargissement de notre gamme de sorte que notre produit trouve un succès et une popularité a **un prix bien étudié et raisonnable.**

Les produits anti-âges hydratants sur le marché international oscillent entre 3- 12 € estimé entre 440 -1800 DA. Le prix du produit soit fixé sur le marché à 1000 DA.

Marché cible

On vise couvrir le marché du médicament, les laboratoires de production et d'autres institutions de secteurs différents (cosmétiques – alimentaire): Les interactions et les transactions se déroulent entre deux entreprises (business to business) .

Exigences légales

Le responsable du système management de la qualité doit s'assurer que des processus appropriés de communication soient établis au sein de l'entreprise et que la communication concernant l'efficacité du système management de la qualité ait bien lieu.

PREPARATIONS PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES

II. Quatrième axe : plan de production et organisation

IV.1. Plan d'organisation

Le processus de préparation et de formulation du produit final implique plusieurs étapes dont :

a-Prétraitement et contrôle

Après la quête , la matière première devrait d'abord subir un contrôle physicochimique et microbiologique et enrichissement par des facteurs de croissance minéraux.

b-Fermentation

La matière primaire qui un subit un prétraitement est ensuite placées dans des propageurs de grand format (500 à 1000 L) et inoculée par une quantité précise de la culture starter « inoculum industriel ».



Fermenteur à grande échelle.

c-Récupération

Les EPS subissent ensuite une étape d'extraction, précipitation et de purification en utilisant des produits non toxiques.

d. Analyse de purification

Une fois purifiés, les EPS sont destinés à un contrôle physicochimique et contrôle de stabilité afin de s'assurer de leur pureté.

PREPARATIONS PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES



Systeme HPLC

e. Séchage

Une fois purifiée, les EPS peuvent être stabilisés via une lyophilisation (séchage sous vide) en considérant certains paramètres de l'approche tout en préservant la qualité du produit.



Sécheur à pulvérisation

f. Conditionnement en poudre

Les EPS destinés aux laboratoires ou aux autres unités sont à l'état anhydre et sont par la suite conditionnés dans des emballages appropriés,

g. Préparation produit CHOLEST-EPS « CEPS »

La formulation finale du produit contient majoritairement et comme ingrédient principal l'EPS individuelle ou en combinaison avec d'autres produits.

IV.1. Plan De Financement

Pour soutenir les activités de l'entreprise. Notre plan de financement comprenant les éléments clés suivantes :

a- Investissements initiaux

On berce notre projet sous la direction de fond national d'investissement. Prêts initiaux : Montant emprunté auprès de banques pour financer les investissements de démarrage.

b- Investissements à moyen/long terme

Équipements et immobilisations : Montant nécessaire pour acquérir des équipements, des locaux ou d'autres actifs à moyen/long terme.

PREPARATIONS PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES

Financement de l'équipement. Moyen terme

Les machines / produits chimiques	Prix
Fermenteur de laboratoire	15 à 20 million de centime
Fermenteur industriel	De 30 à 70 million de centime
Sécheur à pulvérisation	73 million de centime
Système de HPLC : chromatographie à haute pression	180 million de centime
Autoclave	36 million de centime
Spectrophotomètre UV/ Visible	
Réfrigérateur et congélateur	20 million de centime

Financement de l'équipement /long terme.

La machine	Temps
Automobile	250 million de centime
Infrastructure Terrain dans la zone industrielle	2 milliard de centime

• Le Bénéfice de l'entreprise

Au dépend de plusieurs facteurs, notamment les revenus, les coûts et les dépenses. Et selon la formule universelle pour calculer le bénéfice d'une entreprise :

$$\text{Bénéfice} = \text{Revenus totaux} - \text{Coûts totaux} - \text{Dépenses totales.}$$

Les revenus totaux correspondent à l'ensemble des revenus générés par l'entreprise à un début :

On envisage commencer par la production de 1000 boites pendant environs 10 jours.

$$\text{RT} = 1000 \times 1000 \text{DA (prix d'une seule BOITE)} = 2000000 \text{ DA/ jours.}$$

PREPARATIONS PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES

Coût Totaux

<u>Désignation</u>	<u>Nombre/ quantité</u>	<u>Coût</u>
Matières premières	1000 L	Substrat bon marché « Lactosérum »
Main-d'œuvre directe	2 laborantins et 4 agents polyvalents	- Salaire des Laborantins= 2×35000=70000da; - Salaire des agents polyvalents=2×20000 =40000da
		<u>Total 110000 Da</u>
<u>Frais de production :</u>		
- <u>Ethanol</u>	- 3000 L (pour 1000 L de milieu) ;	-Prix 1000 L : 150000 Da. ;
- <u>Emballage</u>	- Les capsules du produit seront mises dans des petites boites en plastique ;	- Prix par unité : 200 Da, soit 200000 Da pour 1000 boites. -INTERNET/ 2000DA -TARIFDES APPELS/2000DA
Coûts totaux = 354000Da		
<u>Dépenses totales</u>	- Electricité et gaz ; -Eau	150000 Da/ 6= 25000 ; 40000/6= 6600 .
<u>Dépenses totaux= 31600 Da</u>		
<u>Bénéfice CLEPS / mois</u> = Revenus totaux - Coûts totaux - Dépenses totales. Soit 1000000 -354000- 31600= 614400 Da		

Calcul de Bénéfice CLEPS

Bénéfice **CLEPS** = Revenus totaux - Coûts totaux - Dépenses totales.

Bénéfice= **614400 Da**

12×**614400Da** = 7372800DA/ANS

Notre bénéfice pour la première année est de 18470064.DA.

PREPARATION PHARMACEUTIQUE BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES

Revenu de la deuxième Année

Espérons une croissance de 20 %, ce qui correspond à des ventes de :

$$2000000 + 2000000 \times 20/100 = \mathbf{2400000 \text{ Da.}}$$

Coûts de production

Les coûts de production peuvent augmenter en raison de l'expansion de l'activité.

Supposons que les coûts de production s'élèvent à **300000** DA.

Dépenses opérationnelles : les dépenses opérationnelles augmentent légèrement pour atteindre **40000** DA.

Bénéfice

Le bénéfice brut pour la deuxième année serait donc :

$$\mathbf{2400000 - 300000 - 40000 = 2060000 \text{ Da / mois}}$$

soit

$$\mathbf{2060000 \times 12 = 24720000 \text{ Da/ ans.}}$$

Revenu de la troisième Année

Supposons une croissance continue : La startup poursuit sa croissance en consolidant sa clientèle existante et en attirant de nouveaux clients.

Espérons pour la troisième année une croissance de 23 %, ce qui signifie des ventes de

:

$$\mathbf{24720000 + (24720000 \times 23/100) = 30405600 \text{ Da/ mois.}}$$

Au fur et à mesure que la production se lance, des recherches complémentaires visant à l'améliorer et augmenter la qualité et donc les fonctionnalités du produit tout en respectant les prix pour couvrir plusieurs marchés

PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIESLACTIQUES

La Production s'élèvent à **400000** DA et les dépenses **48000** DA.

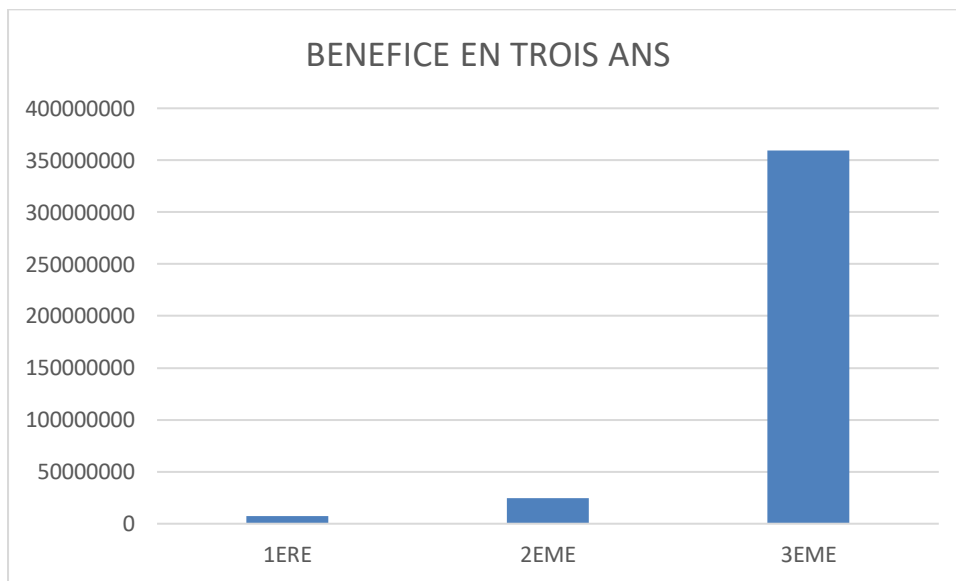
Le bénéfice de la troisième année serait de :

$$30405600 - 400000 - 48000 = 299576600 \text{ Da/ mois}$$

Soit

$$299576600 \times 12 = 359491200 \text{ Da/ ans}$$

La figure ci-dessous illustre l'évolution du bénéfice durant trois ans.



BENEFICE DE 3 ANS

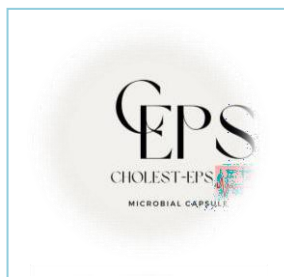
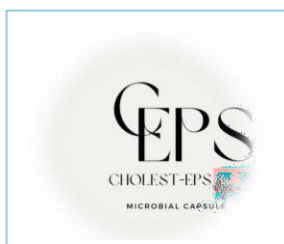
***PREPARATIONS COSMETIQUES A BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIES
LACTIQUES***

PROTOTYPE DU PRODUIT:

CHOLEST-EPSC contient comme ingrédient principal l'EPS des bactéries lactiques ; un polymère de nature visqueuse et de structure variable. Il s'agit d'un bio métabolite considéré comme sur. présenté sous forme de capsule facile a utilisé pour les personnes présentant un déséquilibre lipidique



CEPS
CHOLEST-EPSC
MICROBIAL CAPSULE

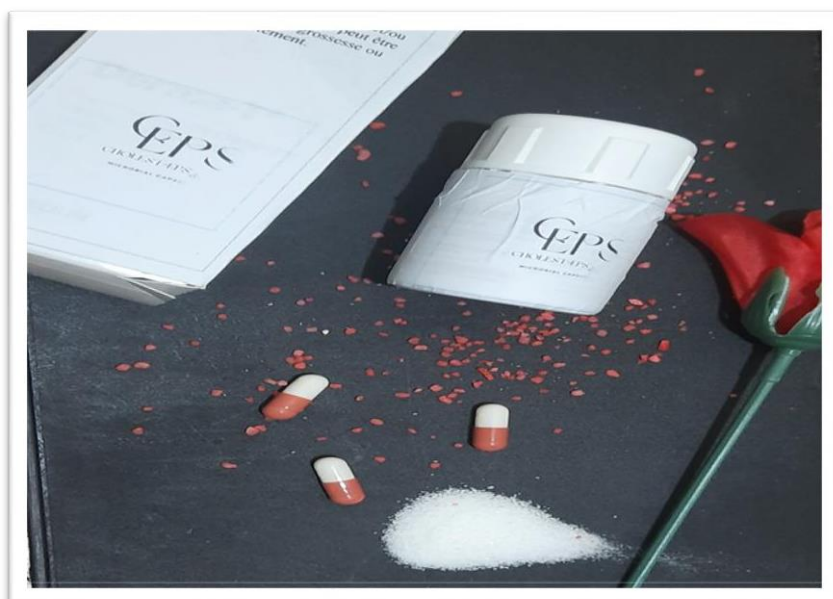


Ce médicament ne doit pas se substituer à une alimentation variée et équilibrée et à un mode de vie sain
Mode utilisation : 2 à 4 capsules par jour au cours du repas

Voie d'administration : Orale
Médicament biosimilaire produit partir de bactéries lactiques probiotiques
Contre indiqué pour les personnes présentant une hypersensibilité à l'un des composants.



CEPS
CHOLEST-EPSC
MICROBIAL CAPSULE



Description : Médicament qui peut être indiqué en cas des niveau élevés de cholestérol et/ou les troubles lipidiques, il peut être prescrit pendant la grossesse ou l'allaitement.



CEPS
CHOLEST-EPSC
MICROBIAL CAPSULE