

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 :

DOBAB Tahani cherifa

MAHROUZ Fadhila

Thème

Préparation cosmétique à base d'exopolysaccharide des
bactéries lactiques

Soutenu publiquement le

Jury :

Président :

Encadrant:

Co-encadrant:

Examineur 1:

Représentant de l'incubateur :

Représentant de secteur socio-economique: Dr. MAHROUZ . I

Grade

Dr.ALI NEHARI AEK MCA

Dr BOUBAKEUR.B MCA

Dr. KHADEM.H MCB

Dr MEZOUAR.D MCA

Pr. SADJL.F Pr

Docteur en médecine

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Louange à **Allah** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'entamer et terminer ce mémoire.

Nous tenons tout particulièrement à exprimer nos remerciements à nos encadrantes **Dr Boubakeur Barda** et **Dr khadem Hafidha**, qui nous ont fait l'honneur de diriger notre travail. Elles nous ont gracieusement encadré et guidé tout au long de son développement, ce dont nous sommes très reconnaissants à l'égard de leurs conseils, disponibilité et travail acharné.

Nos vifs remerciements s'adressent au jury du mémoire ; Dr. ALI NEHARI A et Dr. MEZOUAR Dj d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Nos remerciement s'adressent aussi au staff de département de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université **IBN KHALDOUN TIARET.**

A tous les ingénieurs de laboratoire surtout de Microbiologie pour leur aide le long de notre travail.

Nous tenons également à adresser nos remerciements à tous nos enseignants qui nous ont accompagnés lors de nos études universitaires .

Dédicaces

Tout D'abord « **Dieu** » merci, de m'avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux personnes les plus chers au monde que je ne remerciais jamais assez pour leurs aides, encouragements, soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie : Mes chers parents, que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A toute ma famille

A mon binôme « TAHANI » qui a partagée avec moi les moments difficiles de cette entreprise travail et sa famille.

A tous mes proches, à ma sœur IKRAM et à mon frère Mustapha

Et au frère Dr MAHROUZ TAYAB et sa famille.

A mes amies : SOUHILA, IBTIHAL, KOULOUE.

Sans oublier mes braves amies de la promotion Master II, **Toxicologie et sécurité alimentaire.**

FADHILA

Dédicace

Tout d'abord, Dieu merci d'avoir m'aider à atteindre ce stade d'étude, de me donner la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A l'homme le plus important de ma vie à qui je dois la vie et le succès et tout ce que je suis aujourd'hui : mon cher père **Muhammad**.

La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a dit non à mes demandes et n'a ménagé aucun effort pour me rendre heureuse : ma merveilleuse mère
Noura.

A ma très cher sœur **Imane**

A mon binôme **Fadhila** qui j'ai partagé des moments agréables au cours de notre travail ensemble.

Tous mes chers amis qui ont été toujours avec moi pour leurs aides et soutiens :
Halouma ,Chaimaa, Fatima, Houda, Zayneb.

TAHANI

Liste des figures

Figure N°01 : Protocole expérimentale	07
Figure N°02 : Observation microscopique de <i>S. thermophilus</i> après coloration de Gram	10
Figure N°03 : Production d'EPS par la souche <i>S. thermophilus</i> sur la gélose hypersaccharosé	10
Figure N°04 : Capacité de formation du biofilm total par <i>S. thermophilus</i>	11
Figure N°05 : EPS produit par <i>S. thermophilus</i>	12
Figure N°06 : Corrélation entre l'EPS et le biofilm en fonction de temps de 24h	12
Figure N°07 : Test DPPH avec la cellule bactérienne et l'EPS	13
Figure N° 08 : Capacité antioxydant d'EPS de la souche <i>S. thermophilus</i> et l'acide ascorbique	14

Liste des tableaux

Tableau N° 01 : Matériel employé au cours de l'expérimentation	5 /6
Tableau N° 02 : Résultats de l'aspect macro et microscopique de la souche étudiée	10

Liste des abréviations

EPS: Exopolysaccharide

Test DDPH : Diphenyl-2-Pyridyl-Hydrazine Free Radical Scavenging Assay

Solution PBS : phosphate buffered saline

AA : Acide ascorbique

Test TCA : test total antioxydant capacity

Tableaux de matière

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	I
Liste des tableaux	I
Liste d'abréviation	I
Introduction Générale	1
Chapitre I : Partie expérimentale	5
I.1. Objectifs du travail	5
I.2. Lieu et période de travail	5
I.3. Matériel et produit.....	5
I.3.1. Souches lactiques testées	6
I.3.2. Matériels	6
I.4. Méthode	6
I.4.1. Protocole expérimental	6
I.4.2. Vérification de la pureté de la souche et préparation des aliquotes	7
I.4.3. Screening et sélection de la souche lactique	7
I.4.3.1. Détermination phénotypique de la production d'EPS : Test du rouge Congo.....	7
I.4.3.2. Préparation de l'inoculum.....	8
I.4.4. Estimation quantitative et qualitative du biofilm total.....	8
I.4.5. Analyse quantitative de la production d'EPS	8
I.4.5.1. Dosage et quantification d'EPS	8
I.4.6. Evaluation du potentiel antioxydant des cellules bactériennes entières	9
I.4.6.1. Test DPPH	9
I.4.6.1.1. Cellule entière	9
I.4.6.1.2. EPS produit	9

I.4.6.2 Test TCA (The total antioxidant capacity)	9
Chapitre II : Résultats et discussion	10
II .1 .Vérification de la pureté de la souche	10
II.2. Détermination macroscopique de la production d'EPS : Test de rouge Congo	10
II.3. Estimation quantitative et qualitative du biofilm total	11
II .4. Analyse quantitative de la production d'EPS	11
II.5. Evaluation du potentiel antioxydant des cellules bactériennes entières	13
II.5.1. Test DPPH	13
II.5.1.1. Cellule et l'EPS produit	13
II.5.2. Test TCA avec l'EPS.....	13
Conclusion	15
BMC	
Résumé	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction générale

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la production d'aliments fermentés. Elles contribuent à l'amélioration de goût, de l'apparence et de la sécurité microbiologique des aliments. Ces bactéries partagent des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais sont caractérisées par une faible homologie d'acide nucléique. Elles produisent une variété de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, les peroxydes d'hydrogène, et les bactériocines. Elles sont des cellules vivantes, procaryotes (De Roissart, 1986), sont un groupe des bactéries à Gram-positif, immobiles, asporulées, hétérotrophes, dépourvues de catalase, de nitrate réductase et de cytochrome oxydase (Dellaglio et al, 1994 ; Atlan et al, 2008). Elles sont omniprésentes ; cohabitent différentes niches écologiques telles que le lait et les produits laitiers, les légumes, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et le tube digestif (Drouault et Corthier, 2001) et ne se trouve presque nulle part ailleurs que dans leur habitat naturel (De Roissart, 1986). Les bactéries lactiques utilisées dans les industries agroalimentaires sont considérées comme non pathogènes et ont obtenu le statut d'organisme anglo-saxon GRAS (généralement considéré comme sûr) (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993). Cependant, certains membres des genres *Streptococcus* et *Enterococcus*, ainsi que d'autres bactéries lactiques, sont considérés comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des plantes. Au sein du genre *Streptococcus*, *streptococcus thermophilus* a été isolé à partir de lait pasteurisé, du matériel laitier et de levure artisanale (Jones, 1978).

Les espèces de *Leuconostoc* ont été isolées du lait et des produits laitiers, les fruits, les légumes, les légumes fermentés tels que la choucroute, les produits de boulangerie (Suhigara, 1985) et les confiseries (Devoyod et Poullain, 1988). Les espèces du genre *Leuconostoc* se trouvent principalement chez les humains, les animaux et les oiseaux. D'autre part, le genre *Pediococcus* ne se trouvent en fait que chez les végétaux (Hermier et al, 1992).

Les espèces de *Lactobacillus* se trouvent dans plusieurs milieux différents ; lait et fromages, lait fermenté, produits végétaux fermentée (Desmazeaud, 1996).

Les thermophiles lactiques, cas de *Streptococcus thermophilus*, sont des cocci anaérobies facultatifs immobiles à Gram positif. Elles sont présente dans le lait fermenté et le fromage (Dellaglio et al, 1994 ; Roussel et al, 1994). *Streptococcus thermophilus* est une bactérie du groupe sans antigène, résistante à la chaleur, elle peut résister à 60°C pendant 30

minutes, sensible au bleu de méthylène (0,1) et aux antibiotiques (Dellagio et al, 1994). Elle est isolé du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposées en chaînes ou paires de différentes longueurs. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C et son métabolisme est homofermentaire (Lamoureux, 2000). Elle joue un rôle principal dans l'acidification de l'aliment fermenté, elle est responsable de la texture du lait fermenté, et de sa viscosité en produisant des polysaccharides (composés de galactose, de glucose et de petites quantités de rhamnose, d'arabinose et de mannose (Bergamaier, 2002).

En plus d'être traditionnellement utilisé dans les yaourts en cultures mixtes avec *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* est également utilisé dans la fabrication de nombreux fromages tels que : Emmental, Parmesan, Provolone, Mozzarella et Asiago. Il a également été récemment utilisé avec d'autres ferments mésophiles dans la production de fromage cheddar (Awad et al, 2005). L'un des principaux rôles joués par *Streptococcus thermophilus* dans l'industrie laitière est d'assurer une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Le taux d'acidification dépend de la souche utilisée (Mora et al, 2004). Cependant, l'utilisation de *Streptococcus thermophilus* repose non seulement sur sa capacité de production d'acide lactique, mais également de formiate, d'acétone, d'acétyl et d'acétaldéhyde qui contribuent à la saveur du produit fini. D'autres aspects techniques importants sont également cités, comme la production d'exopolysaccharides (EPS) et de bactériocines (Mora et al, 2004).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreuses formulations cosmétiques comme humectants, émulsifiants et stabilisants. Il a été démontré qu'elles pourraient améliorer la texture de la peau. L'acide lactique est aussi utilisé pour hydrater la peau et traiter ses maladies (Banbar et al, 2022). Le lactate d'éthyle est l'ingrédient actif des traitements contre l'acné (Wee et al, 2006).

La surface des bactéries lactiques est recouverte de plusieurs molécules, dont les polysaccharides font partie. Ils peuvent être associés à certaines molécules de surface sous forme de capsules qui enveloppent la cellule, ou ils peuvent être complètement détachés de la paroi cellulaire et secrétées dans le milieu environnant. (Sutherlans, 1990 ;Mozzi et al, 2001 ;Fanning et al, 2012 ;Hidalgo Canatabrana et al, 2014) d'où leur appellation « exopolysaccharides- EPS ».

Les EPS des bactéries lactiques ont attiré une attention particulière, sont considérés comme sûr et peuvent être utilisés dans les produits alimentaires. Ils ont été prétendus avoir une large gamme de bénéfice vis-à-vis de la santé, y compris les propriétés cardioprotecteurs tels que les activités hypocholestérolémiantes, antioxydantes et immunomodulatrices, en plus des activités prébiotiques et antitumorales (Ahmed *et al*, 2013 ; London *et al*, 2016). Les exopolysaccharides sont des polymères à longue chaîne et de poids moléculaire élevé qui sont secrétés principalement par les micro-organismes et les microalgues dans leurs milieux environnants en cours de croissance (Ismail et Nampoothiri, 2010 ; Souza *et al*, 2012).

Selon leur composition chimique, les EPS des bactéries lactiques sont classés en homopolysaccharides composés d'un seul type de monosaccharide et en hétéropolysaccharides de plusieurs monomères (Sutherland, 1990 ; Zidani, 2015 ; Tahoun *et al*, 2015 ; 2017). Leur propriétés biologiques dépendent de la taille des macromolécules, de leur composition en sucres et de la nature des liaisons sucres présentes (B/e ,1-2, 1-3 ,...) (Benhadria *et al*, 2017).

Les EPS issus de bactéries lactiques présentent des critères intéressants, ce qui rend leur application dans divers domaines tels que l'agroalimentaire, cosmétique, biotechnologique et médical (Hidalgo-Cantabrana *et al*, 2014 ; Kouassi, 2017). Dans l'industrie alimentaire, les EPS sont utilisés pour leur action épaississante ou gélifiante, ils agissent également comme biostabilisants, émulsifiants et agents de viscosité (Ruas-Madiedo, 2010 ; Loper *et al*, 2012 ; Benharia, 2017). Les exopolysaccharides microbiens synthétisés par les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la production de produits laitiers fermentés. Il existe une grande variation dans la production en termes de composition chimique, de quantité, de taille moléculaire, de charge, de présence de chaînes latérales et de rigidité moléculaire (Jolly *et al*, 2002). Les EPS sont produites par de nombreuses espèces de bactéries lactiques : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* sont des bactéries qui sont utilisées dans la fabrication de divers laits fermentés (Ruas-Madiedo *et al*, 2002).

Lors de cette étude, nous avons envisagé l'aspect parapharmaceutique et cosmétique des EPS de *Streptococcus thermophilus* à travers l'évaluation de leur activité antioxydant *in vitro* et donc leur potentielle utilisation comme préparation cosmétique permettant de traiter et prévenir le vieillissement cutané résultant du déséquilibre du statut oxydatif dans la peau.

Les objectifs spécifiques fixés lors de cette expérimentation sont :

Screening des bactéries lactiques productrices d'EPS ;

Etude de corrélation entre la capacité de formation de biofilm et la quantité d'EPS produite ;

Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydant de l'EPS produit et de la souche bactérienne elle-même (*Streptococcus thermophilus*);

Essai de préparation d'un sérum cosmétique à base d'EPS de *Streptococcus thermophilus* ;

Etude *in vitro* de l'activité microbienne du sérum vis-à-vis de la flore cutanée ;

Etude *in vitro* de l'activité antioxydante du sérum préparé ;

Evaluation de la capacité de rétention de l'eau du sérum préparé pour une éventuelle utilisation comme sérum nourrissant et hydratant.

Le manuscrit de ce projet est structuré en trois parties ; la première s'intéresse à englober l'ensemble des démarches expérimentales adoptées suivie par une discussion des résultats et en fin un chapitre sur l'aspect institutionnel et économique du projet (BMC).

CHAPITRE I : PARTIE EXPÉRIMENTALE

I.1. Objectifs du travail

La présente étude s'inscrit dans le cadre de projet start-up, elle envisage en premier lieu la :

- ✓ Sélection de souches à fort potentiel sécrétoire d'exopolysaccharides,
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante de la souche sélectionnée
- ✓ Détermination du potentiel antioxydant de l'EPS produit par le test DPPH, TCA.
- ✓ Formulation d'une préparation pharmaceutique à effet anti-vieillissant en utilisant comme ingrédient principal l'EPS produit.

I.2. Lieu et période de travail

Le travail expérimental s'est déroulé sur une période de deux mois (allant du 30 Janvier au 06 Mars) dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret.

I.3. Matériel et produit

I.3.1. Souches lactiques testées

Le genre *Streptococcus* fait partie de la famille des Streptococaceae de l'ordre des Lactobacilles, Elle regroupe des espèces dont les cellules ressemblent à des coques organisées en chaînes (Hardie et Whiley, 1997 ; Sun et al, 2014) ,

I.3.2. Matériel

Le matériel utilisé est représenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 01 : Matériel de laboratoire utilisé.

Appareillage	<ul style="list-style-type: none">- Autoclave- Bec bunsen- Balance- PH-mètre- Centrifugeuse- Agitateur magnétique thermique- Incubateur- Plaque chauffante- Microscope- Spectrophotomètre(UV)- Bain mari- Vortex
Verrerie	<ul style="list-style-type: none">- Boîte de Petri

	<ul style="list-style-type: none"> - Bécher - Pipette pasteur - Burette - lames - Tube à essai
Produits chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Ethanol - Acide sulfurique - Phénol - PBS (Phosphate buffered saline) - Alcool - NaOH - Hcl - Solution DPPH (Diphenyl-2-Pyridyl-Hydrazine Free Radical Scavenging Assay) - Molybdate d'ammonium - Sulfate de sodium
Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> - M17 bouillon et gélose - Hypérsachcarosé
Les colorants	<ul style="list-style-type: none"> - Fuchsine. - Bleu de méthylène. - Lugol - Violet de gentiane - Rouge-Congo - Cristal violet

Tableau N°1: Matériel employé au cours de l'expérimentation.

I.4. Méthode

I.4.1. Protocol expérimental

La démarche expérimentale avec toutes ses étapes est illustrée dans le schéma ci-dessous

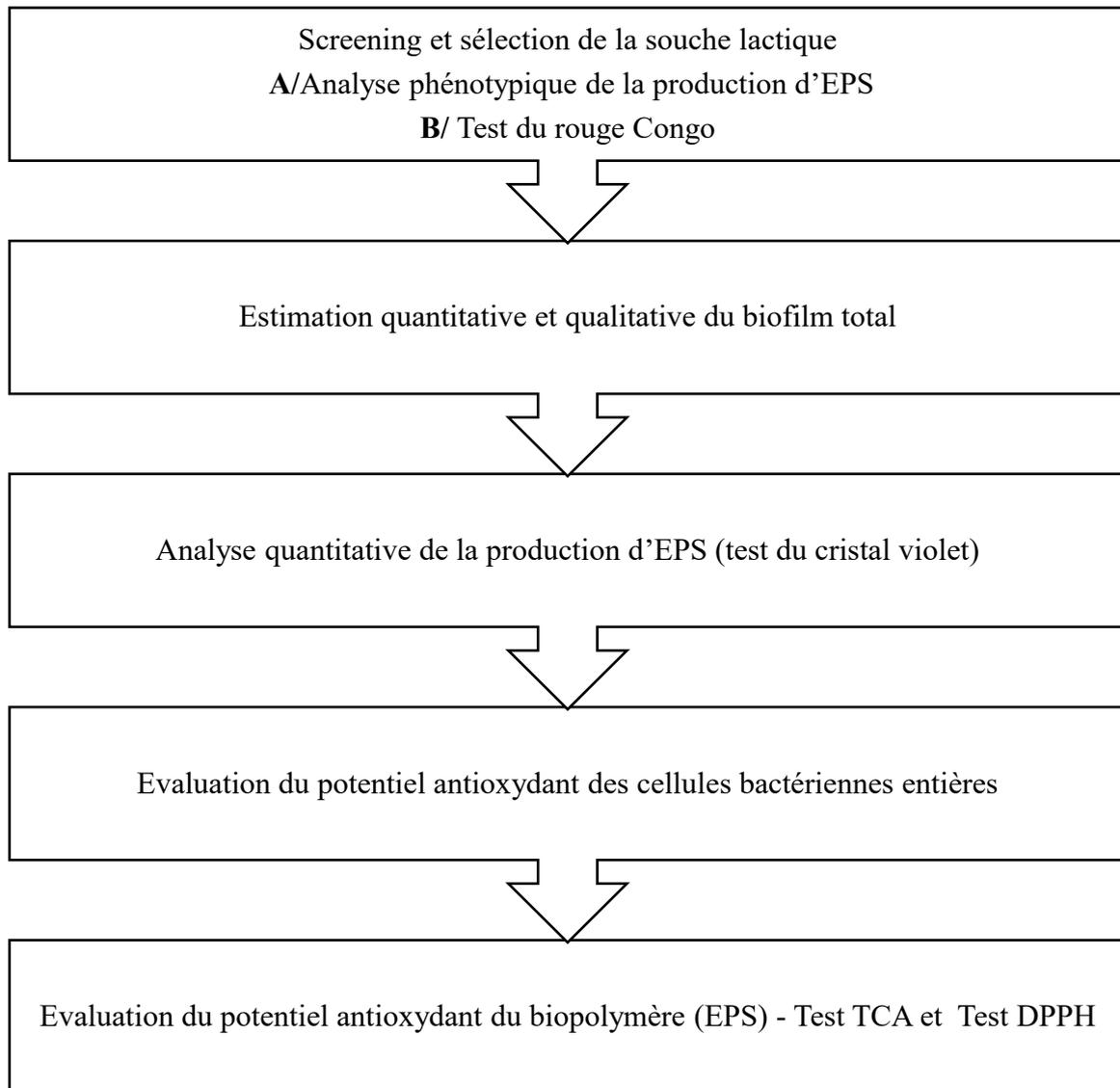


Figure N°1 : Protocole expérimentale

I.4.2. Vérification de la pureté de la souche et préparation des aliquotes

La souche lactique testée dans la présente étude a subi une conservation pour plus d'une année, cela a exigé une vérification de sa pureté avant d'entamer les différentes analyses microbiologiques. En effet, après revivification de la souche 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 macroscopiques (Aspect des colonies, leur couleur et leur forme) ; et microscopique (coloration de Gram) ont été réalisées pour confirmer la pureté de l'espèce étudiée.

1.4.3. Screening et sélection de la souche lactique

1.4.3.1. Détermination phénotypique de la production d'EPS : Test du rouge Congo

Plusieurs souches lactiques ont été testées pour leur production d'EPS dont *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus durans* et *Pediococcus spp.* Le test du rouge Congo a été réalisé en adoptant le protocole de **Freeman, et Falkiner (1989)**

La seule souche retenue pour cette étude est *S. thermophilus*, les deux souches lactiques dont *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 du temps accordée.

1.4.3.2. Préparation de l'inoculum

Les cellules de *S. thermophilus* provenant d'une culture pure ont été transférées dans un milieu M17 et ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Ensuite, la culture a été inoculée dans M17 bouillon dans des tubes à essai, incubée pendant 24 h à 37°C et utilisée pour les différents tests.

1.4.4. Estimation quantitative et qualitative du biofilm total

L'inoculum de la souche est préparé dans un milieu liquide M17 est normalisé en densités optiques (DO) de 0,112(10⁸). En série de tubes nous ajoutons : 2,25 ml de milieu(M17) et 0,25 ml de l'inoculum. La série est incubé à 45°C pendant 24h.

L'estimation de biofilm a été faite selon le protocole d'**O'Toole (2011)**.

Après incubation, le milieu est éliminé puis un rinçage triple a été réalisé sur les culture en tube. Pour visualiser le biofilm total, une coloration a été réalisée en utilisant le cristal violet.

Après prise de photo, le biofilm a été détaché afin de le mesurer. Le biofilm est détaché en utilisant l'acide acétique à 30%.

La densité optique des cellules bactériennes formant le biofilm a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm.

I.4.5. Analyse quantitative de la production d'EPS

La production d'EPS a été effectuée dans des conditions optimales (Milieu hypérsaccharosé, pH4.5, 37°C, 24H) selon le protocole de **Ricciardi et al (2002)**. Brièvement, une suspension jeune de *S. thermophilus* a été thermisée dans un bain marri à 80°C pendant 15 min avec une agitation chaque 5 min, les tubes sont ensuite centrifugés à 5000 g par minute pendant 15 min et le surnageant récupéré a été ensuite stérilisé en utilisant un filtre millipores de 45µm e diamètre. Un volume d'éthanol a été ajouté dans le but de précipiter l'EPS. Après une précipitation de 12h, le mélange a été centrifugé à -4 °C, 12000g, 20 min. La précipitation en utilisant l'éthanol a été faite trois. L'EPS en culot a été récupéré et solubilisé dans de l'eau distillée stérile. Il a été conservé au froid pour une utilisation ultérieure.

1.4.5.1. Dosage et quantification d'EPS

La méthode de Dubois et coll (1956) a été adoptée pour la quantification de l'EPS produit, elle consiste à introduire dans un tube un volume de 0.5ml de la solution mère d'EPS ou de ses dilutions (1/10, 1/100), 0.5 ml de phénol et 2.5ml d'acide sulfurique, après agitation du mélange, la DO a été lue à 490nm contre un blanc (où l'échantillon a été remplacé par l'eau distillé).

1.4.6. Evaluation du potentiel antioxydant des cellules bactériennes entières

1.4.6.1. Test DPPH

1.4.6.1.1. Cellule entière

Le potentiel antioxydant de *S. thermophilus* a été évalué comme décrit par Mansouri et al (2005). Une culture jeune de 18h a été centrifugée à 4000 tours par minute pendant 5 min, le culot récupéré a ensuite été solubilisé dans le PBS et a subi un lavage trois fois dans les mêmes conditions. La charge cellulaire a finalement été ajustée à 578nm pour obtenir une DO=1.

2ml de la suspension ajustée a été mélangé à 1ml DPPH, la mixture a été incubée à l'obscurité pdt 30 min, et une prise de la DO à 517 nm a été faite contre un blanc (en remplaçant l'échantillon par le PBS), Le potentiel antioxydant a ensuite été calculé selon la formule suivante :

$$[(1 - Ae) \div Ab] \times 100$$

- Ae=absorbance de l'échantillon
- Ab=absorbance du blanc.

1.4.6.1.2. EPS produit

Le même protocole (détaillé dans la section 1.4.6.1) a été adopté pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'EPS produit par *S.thermophilus*. La DO du mélange a été lue à 517 nm.

1.4.6.2 Test TCA (The total antioxidant capacity)

Le test TCA décrit par **Koracevic et al (2001)** a été aussi adopté pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'EPS Produit. Une solution de TCA a été préparée en mélangeant 1.235 g de molybdate d'ammonium (4mM), 0.9942 g du sulfate de sodium (28mM) dans 250 ml d'eau distillée. A 0.1 ml de la solution mère de l'EPS et de ses dilutions (10^{-1}) a été ajouté 1 ml de TCA, la DO du mélange a été prise à 695 nm contre un blanc. La capacité antioxydant a été estimée en utilisant la formule suivante :

$$[(Ab - Ae) \div Ab] \times 100$$

- Ae=absorbance de l'échantillon
- Ab=absorbance du blanc

1.4.7. Traitement des données

Tous les tests ont été réalisés en duplique et les moyennes +/- écart-types standards sont présentés dans les graphes. La significativité des données sont obtenues par le test ANOVA, une direction et le test post-hoc de Bonferroni et au moins une confirmation (répétition) est conduit pour chaque test. Le logiciel utilisé est SPSS.

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1 .Vérification de la pureté de la souche

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique sont résumés dans le tableau N°2 et les figures N°2.

Tableau N°2 : Résultats de l'aspect macro et microscopique de la souche étudiée.

Test étudié \ souche	<i>S.thermophilus</i>
Aspect macroscopique (repiquage sur le M17)	Colonies rondes de couleur blanche
Aspect microscopique (coloration de gramme)	Coques à Gram positif, groupés en paires ou en chaînes

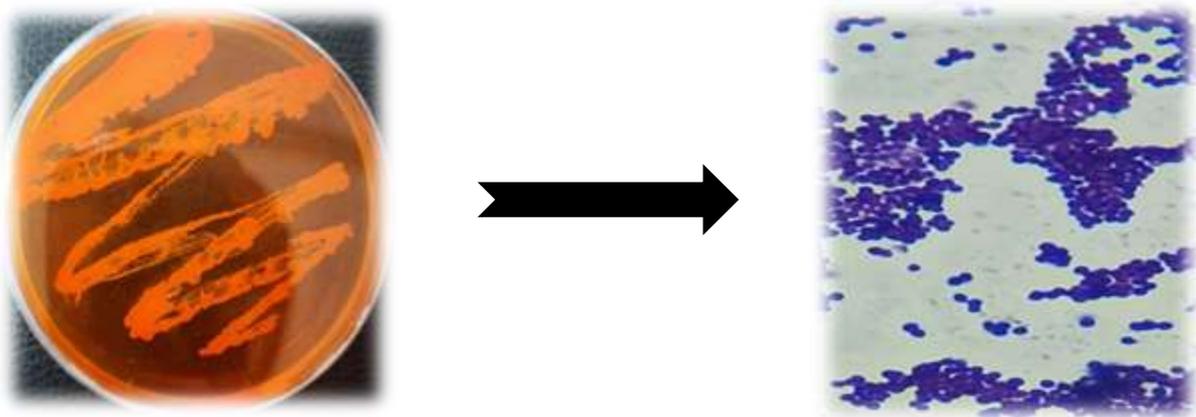


Figure N°2 : Observation microscopique de *S. thermophilus* après coloration de Gram ($\times 1000$).

II.2. Détermination macroscopique de la production d'EPS : Test de rouge Congo

Streptococcus thermophilus est apparu sous forme de colonies blanchâtres et visqueuses sur la gélose hypersaccharosée additionné du colorant rouge congo (Figure N°3) ce qui indique sa capacité de la production des EPS.



Figure N° 3: Production d'EPS par la souche *S. thermophilus* sur la gélose hypersaccharosée

Cet aspect, qui indique une bonne production d'EPS, est comparable à celui trouvé par Freeman et Falkiner (1989).

II.3. Estimation quantitative et qualitative du biofilm total

Les résultats de la formation de biofilm par la souche *S. thermophilus* en fonction du temps (24h -48h) obtenus après la lecture au spectrophotomètre ont permis de tracer l'histogramme ci-dessous (figure N°4). Le biofilm formé après 48h d'incubation (1.25 DO) est supérieure à celui obtenu après 24h (0,1295 DO). Cette différence significative (p-value 0.043) de quantité de biofilm formé est expliquée par la tendance de la cellule bactérienne à s'organiser en biofilm lorsque le milieu de culture s'épuise en nutriment et devient défavorable à la croissance. Ces résultats sont en parfaite concordance avec les travaux de Mgomi Yuan (2021) et Boubakeur et al (2022) qui ont montré que le biofilm se forme sur différentes surfaces au fil du temps après épuisement de milieu de culture en nutriment permettant une croissance planctonique.

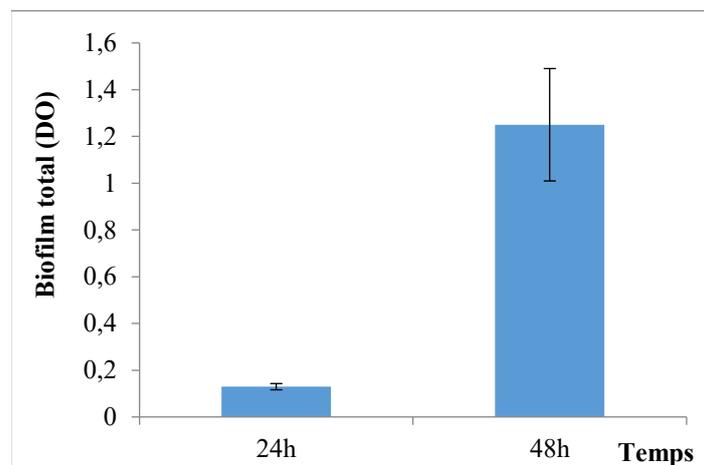


Figure N°4 : Capacité de formation du biofilm total par *S. thermophilus*.

II .4. Analyse quantitative de la production d'EPS

La figure N°5 représente la quantité d'EPS excrétée par *S. thermophilus*. L'examen macroscopique d'EPS indique un aspect visqueux de couleur blanchâtre.

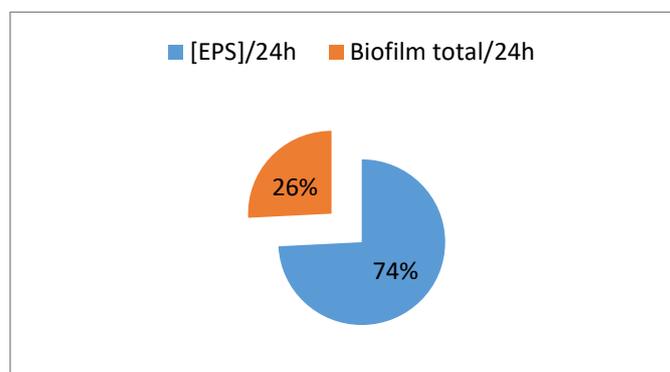


Figure N°5 : EPS produit par *S. thermophilus*

Nos résultats sont en accord avec l'étude de **Pham *et al* (2000); Broadbent (2003)** qui ont reporté une première démonstration que *Streptococcus thermophilus* peut produire les EPS sur un milieu hypersaccharosé ou lactosé où le saccharose ou le lactose est la seule source du carbone.

Le rendement maximal d'EPS de *S. thermophilus*, obtenue après fermentation de 24 h, est de 254.5 mg équivalent de glucose/L. **Cirrincione et al (2018)** et **De De Vuyst et al (2001)**, lors de leurs études sur la production d'EPS des bactéries lactiques, ont démontré une production qui se varie entre 10 – 400 mg/l dans des conditions non optimales et peut être multiple dans des conditions idéales. De leur part **Boubakeur et al (2018)** ont enregistré une efficacité de 200 mg équivalent de glucose/ml.

Une corrélation significative ($p\text{-value}=0.001$) a été enregistré entre la formation de biofilm et la quantité d'EPS produite (figureN°6).



FigureN°6 : Corrélation entre l'EPS et le biofilm en fonction de temps de 24h

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Khadem et al (2020)** et **Boubakeur et al (2022)** qui ont montré que la production des EPS de *S. thermophilus* semble être associée à la formation de biofilm.

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés dans une matrice polymérique (EPS) et attachés à une surface (**Yannick Tremblay et al 2014**).

Les mécanismes moléculaires qui régulent la formation de biofilm varient considérablement entre les différentes espèces, et varient même entre les différentes souches de la même espèce (**Boubakeur et al 2020**). Cependant, certaines caractéristiques sont reconnues comme des attributs généraux de la formation de biofilm. Par exemple, tous les biofilms contiennent une matrice extracellulaire qui maintient les cellules ensemble. Cette matrice est souvent composée d'un bio-polymère polysaccharidique avec d'autres composants tels que des protéines ou de l'ADN. La nature de l'exopolysaccharide matriciel varie considérablement en fonction des conditions de croissance, du milieu et des substrats (**Boubakeur et al 2020**). Cette particularité explique clairement la corrélation exprimée entre la formation de biofilm et la quantité d'EPS produite.

II.5. Evaluation du potentiel antioxydant des cellules bactériennes entières

II.5.1. Test DPPH

II.5.1.1. la cellule et l'EPS produit

Dans la figure N°07, L'activité antioxydant de la souche utilisée avec son EPS produit ont des pourcentages de 50.41% et de 20.44% respectivement.

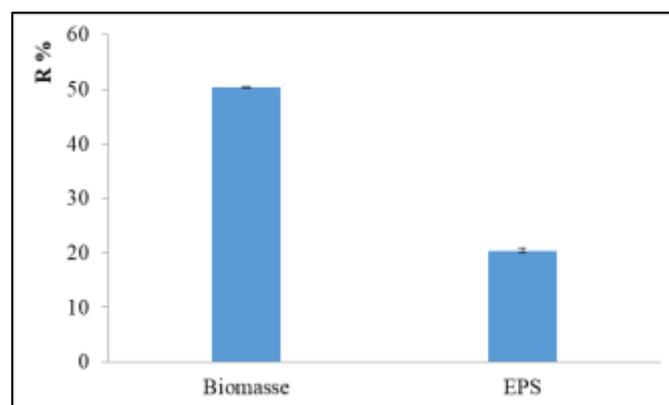


Figure N°07 : Test DPPH avec la cellule bactérienne et l'EPS.

La biomasse s'est révélée plus active, elle a exprimé une activité antioxydante très significative (p-value= 0.001) en utilisant le test DPPH.

L'étude de **Shengjie Li et al 2014** et **Xiangna Lin et al 2018** a confirmé les résultats obtenus dans nos travaux de les activités antioxydants des bactéries lactiques et leurs métabolites (EPS) .

II.5.2. Test TCA avec l'EPS

Les résultats de ce test sont représentées dans la figure N°08, les pourcentages de la capacité antioxydante en fonction de la concentration de l'EPS synthèse et l'acide ascorbique sont $C_1= 0.3 \text{ mg/ml}$ (19.8 %) et $C_2=0.375 \text{ mg/ml}$ (94.42 %) et $[AA] =0.176 \text{ mg/ml}$ (66.84%).

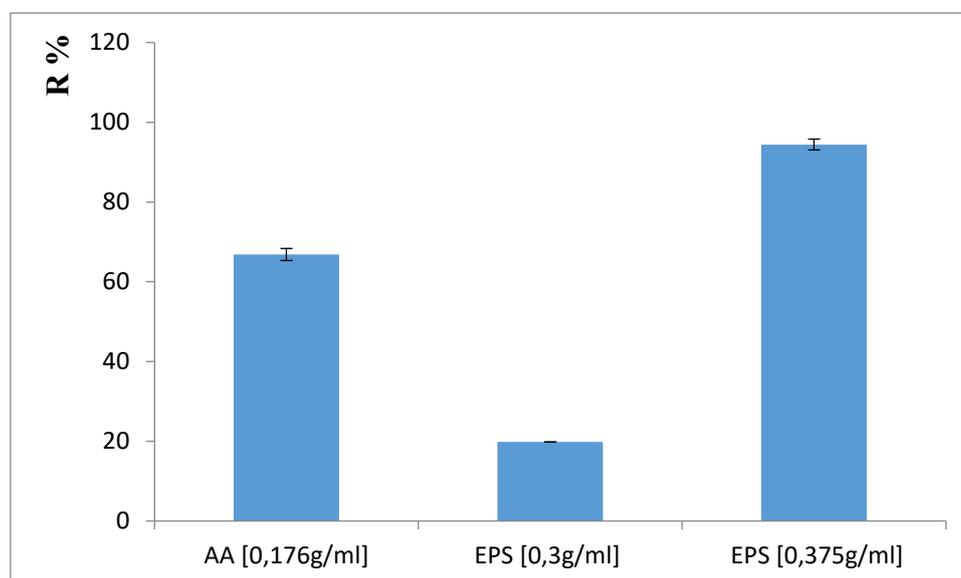


Figure N° 08 : Capacité antioxydant d'EPS de la bactérie *S. thermophilus* et l'acide ascorbique

Adebayo et al (2020) et **Zheng et al (2006)** ont démontré le pouvoir antioxydant élevé des EPS produit par les bactéries lactiques. Ils ont noté une relation proportionnelle entre le pouvoir antioxydant et la concentration des EPS.

Deux mécanismes pourrait expliquer e pouvoir antioxydant des EPS ; la forte capacité des EPS de se complexer avec certains minéraux essentiel à la génération des radicaux libres et la possibilité de neutralisation directe des radicaux libres. Ces deux mécanismes sont liés à la présence des groupement OH.

CONCLUSION

CONCLUSION

Divers effets santé ont été attribués aux exopolysaccharides des bactéries lactiques (hypocholestérolémiant, immunomodulateur, antimoral, antioxydants, antiadhésifs et antimicrobiennes). Ainsi notre propos était d'évaluer l'activité antioxydante des EPS pour une potentielle utilisation des EPS comme une préparation cosmétique permettant de prévenir le vieillissement du a stress oxydatif cutané.

A l'instar des résultats obtenus, un rendement maximale d'EPS a été enregistré dans des conditions de culture optimales (milieux de culture hypersaccharosé la température d'incubation 37°C et PH 4.5), soit une quantité de 254.5 mg équivalent de glucose/ml. Néanmoins une optimisation rigoureuse de l'ensemble des conditions de la production des EPS est fortement recommandée.

Une forte corrélation a été enregistrée entre la production d'EPS et la formation de biofilm. Plus de 70% d'EPS ont été produits par une communauté bactérienne de 26%. Il est intéressant d'étudier le mécanisme de corrélation entre la production d'EPS produite et les différentes étapes de formation de biofilm afin de comprendre les conditions globales liée à la bonne efficience en EPS.

Un pouvoir antioxydant très prononcé a été enregistré pour les EPS et la souche elle-même en utilisant les deux Test ; DPPH et TCA.

Les résultats préliminaire de cette étude laissent suggérer que les EPS de *S. thermophilus* pourraient être requis pour la protection contre les dommages oxydatifs permettant ainsi de prévenir le vieillissement de la peau lié au stress oxydatif. Pour tirer de conclusion concernant leur utilisation comme préparation cosmétique contre le vieillissement, il est fortement recommandé de tester plusieurs protocoles (*in vitro* et *in vivo*).

Références bibliographiques

B. Adebayo-Tayo, R. Fashogbon *Heliyon* 6 (2020) e03268 . In vitro antioxidant, antibacterial, in vivo immunomodulatory, antitumor and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus*

Boubakeur B., Drabo S.M., Khadem H., Savadogo A., (2020). Antimicrobial, antibiofilm, and probiofilm effects of gallic acid on exopolysaccharide-dependent and -independent biofilm of model strains *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

Boubakeur B., Drobo S. M., Khadem H., Mullier C., Tirtouil A. (2018), Influence of the exopolysaccharides of polyphenol conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation , *Ukrainian Journal of Ecology* , ,

Cirrincone, S., Breuer, Y., Mangiapane, E., Mazzoli, R., & Pessione, E. (2018). ‘Ropy’ phenotype, exopolysaccharides and metabolism: Study on food isolated potential probiotics. *LAB. Microbiological Research*, 214, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.004> *Dairy Journal*, 11, 687–707. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00114-5)

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., & Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International*

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–350. **FAO/WHO (2001)** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R. & Patrick, S. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. 1989;872–874.

Hardie, J. M., and R. A. Whiley. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 26:IS-US

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48:412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Khadem H., Meddah T.A., Drabo M.S., Boubakeur B., (2020). Ultrasound conditioning of *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447: growth, biofilm formation, exopolysaccharide production, and cell membrane permeability. *BioTechnologia* vol. 101 (2) C pp. 159–165. <http://doi.org/10.5114/bta.2020.94774> .

Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, et al. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001;54:356–61.

Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemist.* 89 (2005) 411-420.

Mgomi FC, Yuan L, Chen C, Zhang Y, Yang Z. Bacteriophages: a weapon against mixed-species biofilms in the food processing environment. *J Appl Microbiol* 2021: 1–15. <https://doi.org/10.1111/jam.15421>. 00.

O'Toole G.A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. J. Vis. Exp. 47: 1–3.

Pham. P. L, Dupont .I, Roy. D, Lapointe. G et Cerning. J., 2000. Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology.

Ricciardi A., Parente E., Crudele M.A., Zanetti F., Scolari G., Mannazzu I. (2002) Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *J. Appl. Microbiol.* 92: 297–306.

Shengjie Li , Renhui Huang , Nagendra P. Shah , 1 Xueying Tao , Yonghua Xiong , and Hua Wei ., 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315, *Journal of Dairy Science* Vol. 97 No. 12, 2014.

Xiangna Lin¹, Yongjun Xia¹ , Guangqiang Wang¹ , Yijin Yang¹ , Zhiqiang Xiong¹ , Fang Lv¹ ,Wei Zhou² and Lianzhong Ai¹. Lactic Acid Bacteria With Antioxidant Activities Alleviating Oxidized Oil Induced Hepatic Injury in Mice. ORIGINAL RESEARCH article *Front. Microbiol.*, 06 November 2018 Sec. Food Microbiology Volume 9 - 2018 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02684>.

Yannick D.N.T ., Hathroubi S., Jacques M ., 2014 . Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. <https://www.researchgate.net/publication/263610777>.

Zheng, W., Chen, C., , Cheng, Q., Wang, Y., Chu, C., 2006. Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *International Immunopharmacology* 6 (2006) 1093–1099.

Résumé

Les EPS des bactéries lactiques ont attiré une attention particulière et sont considérés comme sûrs et peuvent être utilisés. Néanmoins, les fonctions physiologiques des EPS bactériens sont encore inconnues et seulement quelques EPS bactériens ont été exploités à des fins et applications pharmaceutiques. Ils ont été prétendus avoir une large gamme de bénéfices vis-à-vis de la santé, y compris les propriétés cardioprotectrices telles que les activités hypocholestérolémiantes, antioxydantes et immunomodulatrices, en plus des activités prébiotiques et antitumorales. Ainsi le but de notre étude était, sur le premier plan, l'estimation de la capacité d'une bactérie lactique *Streptococcus thermophilus* à produire les EPS tout en estimant l'impact du temps sur le rendement et de la formation de biofilm. En deuxième plan, nous étions intéressés à l'utilisation potentielle des EPS comme préparation cosmétique à travers l'évaluation de leur activité antioxydante. La production des EPS a été faite dans des conditions de culture préalablement déterminées ((milieu hypérsaccharosé, pH4.5, 37°C). Une corrélation entre la quantité d'EPS produite et le biofilm formé a été enregistrée. L'activité antioxydante a été évaluée par la technique de DPPH et de TCA. Les résultats indiquent une production maximale d'EPS d'ordre de 254.5 mg équivalent de glucose/ml et une activité antioxydante notable. Ces résultats laissent suggérer que les EPS de *S. thermophilus* pourraient être utilisés comme préparation cosmétique afin de prévenir le vieillissement cutané lié au stress oxydatif.

Mots clés: Exopolysaccharide , *Streptococcus thermophilus* , Activité antioxydante, DPPH , bactéries lactique , vieillissement cutané .

Abstract

The EPS of lactic bacteria have attracted special attention and are considered safe and can be used. Nevertheless, the physiological functions of bacterial EPS are still unknown and only a few bacterial EPS have been exploited for pharmaceutical purposes and applications. They have been claimed to have a wide range of health benefits, including cardioprotective properties such as hypocholesterolemic, antioxidant and immunomodulatory activities, in addition to prebiotic and antitumor activities. Thus the aim of our study was, in the foreground, to estimate the capacity of *Streptococcus thermophilus* to produce EPS while estimating the impact of time and biofilm formation. Second, we were interested in the potential use of EPS as a cosmetic preparation through the evaluation of their antioxidant activity. Production of EPS was done under pre-determined culture conditions (hyperosaccharosed medium, pH4.5, 37°C). A correlation between the amount of EPS produced and the biofilm formed was recorded. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH and TCA technique. The results indicate a maximum EPS production of 254.5 mg glucose equivalent/ml and a noticeable antioxidant activity. These results suggest that *S. thermophilus* EPS could be used as a cosmetic preparation to prevent skin aging due to oxidative stress.

Keywords: Exopolysaccharide , *Streptococcus thermophilus* , Antioxidant activity, DPPH , lactic bacteria , skin aging

ملخص

جذبت EPS للبكتيريا اللبنية اهتمامًا خاصًا وتعتبر آمنة ويمكن استخدامها. ومع ذلك، لا تزال الوظائف الفسيولوجية لـ EPS البكتيرية غير معروفة ولم يتم استغلال سوى عدد قليل من EPS البكتيرية للأغراض والتطبيقات الصيدلانية. وقد زُعم أن لديهم مجموعة واسعة من الفوائد الصحية، بما في ذلك الخصائص الوقائية للقلب مثل نقص كوليسترول الدم ومضادات الأكسدة والأنشطة المناعية، بالإضافة إلى الأنشطة البريبايوتيكية والأنشطة المضادة للأورام. وهكذا كان الهدف من دراستنا، في المقدمة، هو تقدير قدرة بكتيريا *Streptococcus thermophilus* اللاكتيكية على إنتاج EPS مع تقدير تأثير زمن الحضان وتشكيل الأغشية الحيوية. ثانيًا، كنا مهتمين بالاستخدام المحتمل لـ EPS كمستحضر تجميلي من خلال تقييم نشاطهم المضاد للأكسدة. تم إنتاج EPS في ظل ظروف زراعية محددة مسبقًا) وسط مفرط الرسم، pH4.5، 37 درجة مئوية، (تم إجراء علاقة بين كمية EPS المنتجة والغشاء الحيوي المتشكل. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة تقنية DPPH. تشير النتائج إلى أن الحد الأقصى لإنتاج EPS هو 254.5 ملغ من مكافئ الجلوكوز/مل ونشاط مضاد للأكسدة معتبر. تشير هذه النتائج إلى أنه يمكن استخدام *S. thermophilus* EPS كمستحضر تجميلي لمنع شيخوخة الجلد بسبب الإجهاد التأكسدي.

الكلمات الرئيسية: Exopolysaccharide ، *Streptococcus thermophilus* ، نشاط مضاد للأكسدة، DPPH ، بكتيريا اللاكتيك، شيخوخة الجلد.

Business Model

Canvas



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 start-up

*Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide de
bactéries lactiques- sérum anti-âge hydratant
Hydra- LABslime*

Nom de l'entreprise

HLS



Nom commercial Hydra- LABslime



Année universitaire : 2022 _ 2023.

TABLE DE MATIERE

I. Premier axe :	05
I.I. Valeurs suggérées	
a. Des valeurs innovantes et nouvelles :	05
b. Valeur personnalisée :	05
c. Valeur par conception :	05
d. Valeur de prix :	05
e. Valeur de haute performance :	05
I.2. Equipe de travail :	05
I.2.1. Objectifs du projet :	06
a. Chronologie de réalisation du projet :	06
II. Le deuxième axe :	06
II.1. Aspects innovants :	
66III. Troisième axe : Analyse stratégique du marché -----	06
III.1. main d'œuvre :	06
III 2. Concurrent :	07
III 3. Marché cible :	07
III 4. Les exigences légales	07
IV. Quatrième axe : plan de production et organisation -----	08
IV.2. Plan De Financement	10
a- Investissements initiaux :	11
b- Investissements à moyen/long terme :	12
IV.3. Bénéfice de l'entreprise :	15
IV.4. Prototype	16

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: BOUBAKEUR Badra مساعد المشرف: KHADEM Hafidha

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	DOBAB Tahani
		MAHROUZ Fadhila

I. Premier axe

Préparation d'un sérum anti-âge à base d'exopolysaccharide de bactéries lactiques

I.I. Valeurs suggérées

a. Valeurs scientifiques

L'intérêt scientifique pour l'étude des bactéries lactiques comme sources de nouveaux composés pour leur transformation en agents thérapeutiques et cosmétiques a considérablement augmenté. Nombreuses études ont documenté l'efficacité des métabolites de ce groupe bactérien y compris les exopolysaccharides (EPS).

L'effet stimulateur des exopolysaccharides, testé par Boubakeur et ses collaborateurs, sur la croissance et le métabolisme des bactéries bénéfiques constituant le microbiome intestinal était très notable. Les EPS se sont révélés très utiles pour la diversification du microbiome et pour la restauration de son équilibre.

L'étude que nous avons menée sur l'activité antioxydante *in vitro* des EPS d'une bactérie lactique d'intérêt a été évaluée à l'état pur et en synergie avec la cellule bactérienne productrice en utilisant deux protocoles. L'extrait a exercé un effet stimulateur de la croissance, l'adhésion et la formation de biofilm des probiotiques. Les EPS ont exercé un effet antioxydant notable.

b. Valeurs innovantes et nouvelles

Ce Sérum cosmétique à base de produit naturel, issue de bactérie lactique, nous permet de remplacer les produits synthétisés par voie chimique qui pourraient avoir des effets secondaires indésirables. Sa composition ainsi que la matière première utilisée constituent un grand atout permettant une réduction importante des coûts de production. Le produit sera destiné aux populations de différents âges.

c. Valeur personnalisée

L'extraction du principe actif « EPS » se fait à partir des bactéries lactiques suite à un screening rigoureux de bactéries formatrices de biofilm et productrices d'EPS.

d. Valeur par conception

Le produit se distingue par un design simple similaire aux produits disponibles sur le marché.



e. Valeur de prix

Le produit visé sera moins couteux par rapport à la matière première utilisé pour la production du principe actif, le lactosérum enrichi.

f. Valeur de haute performance

Le principe actif, EPS, a montré une forte activité prébiotique vis-à-vis une large gamme de bactéries bénéfiques et une grande capacité de rétention de l'eau et une affinité vis à vis des radicaux libres (activité antioxydante élevée) ce qui rend le produit très efficace comme un **agent thérapeutique rééquilibrant** permet de **reconstituer** la flore cutanée, **renforcer** les barrières naturelles de l'épiderme, d'**hydrater** la peau et de **prévenir** son vieillissement sous l'effet du stress oxydatif. En effet **le projet pourra atteindre une envergure nationale et internationale avec la possibilité de l'exporter à l'étranger.**

I.2. Equipe de travail

Actuellement, l'équipe de travail est composée des étudiantes Dobab Tahani et Mahrouz Fadhila inscrites en master 2 Toxicologie et sécurité alimentaire sous la direction des docteurs Boubakeur Badra et Khadem Hafidha, spécialisée en microbiologie et tout particulièrement l'utilisation des biomolécules d'origine microbienne comme alternatives innovantes permettant de générer des produits d'intérêt pharmaceutique et médical de haute performance tout en réduisant les frais de la production.

I.2.1. Objectifs du projet

Notre mission est le développement, la fabrication, le conditionnement et la commercialisation d'un produit bio d'intérêt cosmétique.

Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide des bactéries lactiques

a. Chronologie de réalisation du projet

Pour une quantité d'EPS de 250g/1000 L préparant environ 1000 ampoules de 6 ml de sérum Hydra-LABSlime	
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

II. Deuxième axe

Aspects innovants

Les microorganismes ont la propriété de synthétiser des polysaccharides ou polyosides, ces composés constituent jusqu'à 60% du poids sec du corps cellulaires. Les bactéries lactiques produisent ces polysaccharides en tant que composants de la paroi cellulaire et des polymères de stockage. **De point de vue technologique**, les exopolysaccharides peuvent agir comme viscosifiants, stabilisants, gélifiants et /ou agents de rétention d'eau, adsorbants sélectifs, et additifs rhéologiques dans les aliments, les médicaments, et les produits industriels. **De point de vue pharmaceutique**, les EPS sont associés aux propriétés physiologiques diverses ; prébiotiques, anti-tumuroales, anti-cholestérol, anti-inflammatoire, antioxydante, immuno- modulatrice, antibiofilm. **De point de vue cosmétique**, les EPS constituent aujourd'hui une matrice innovante pourrait équilibre le microbiome cutané, hydrater la peau, et prévenir le stress oxydatif cutané. La peau sera donc amélioré et nourrie et plus lumineuse.

III. Troisième axe : Analyse stratégique du marché

III.1. Main d'œuvre

III.1.1. 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 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 EPS 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 .

Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide des bactéries lactiques

III.2. Concurrent

Il existe des industries et pharmaceutiques et institutions cosmétique dans le même secteur à l'échelle mondiale, où les EPS pourraient être utilisés comme ingrédient dans la préparation des crèmes et sérums anti-âge et hydratantes. Nous ambitionnons de renforcer notre position à travers l'adoption d'une stratégie permettant d'assurer une forte pénétration du produit dans la peau. Plus leurs fortes activités et fonctionnalités élevés (comme texturant, hydratant, antioxydant), les EPS sont aussi caractérisés par leur nature qui facilite la réduction maximale de leur poids moléculaire, une propriété très recherchée dans les différents produits d'intérêt cosmétique. Nous visons aussi la mise à disposition aux clients un produit bio à usage cutané de haute qualité et efficacité tout en réduisant tout éventuel effet indésirable vis-à-vis de la santé et de l'environnement.

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 à **un prix raisonnable**.

Les produits anti-âges hydratants sur le marché international oscillent entre 50- 100 \$, estimé entre 700 -20000 DA.

Nos analyses et stratégie sur le marché national aboutissent que notre produit sera d'un prix concourrait de 3000 DA.

III.3. Marché cible

Les laboratoires pharmaceutiques et parapharmaceutiques et les institutions cosmétiques : Les interactions et les transactions se déroulent majoritairement entre deux entreprises (business to business) et pourraient aussi concerner des consommateurs individuels.

III.4. 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.

IV. Quatrième axe : plan de production et organisation.

IV.1. Plan d'organisation

La chaîne de formulation du produit final se résume par une description générale des étapes impliquées dans la chaîne de production:

a-Prétraitement et contrôle

Après l'Acquisition, 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 prétraitée devrait être ensuite placées dans de grandes cuves ou fermenteurs de capacité allant de 500 à 1000 L et inoculée par une quantité précise de la culture starter « inoculum industriel ».



Fermenteur à grande échelle.

c-Récupération

Les EPS sont ensuite extraits de la culture en procédant à des centrifugation et précipitation selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes.

d. Analyse de purification

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



Système HPLC

e. Séchage

Une fois purifiée, les EPS généralement déshydratée pour enlever l'excès d'humidité. Cela peut se faire par séchage à l'air, lyophilisation (séchage sous vide) ou séchage par pulvérisation.



Sécheur à pulvérisation

f. Conditionnement en poudre

Les EPS destinés aux laboratoires et institutions cosmétiques sont en poudre ensuite conditionnée dans des emballages appropriés, tels que des sacs ou des boîtes, prête à être expédiée et distribuée pour une utilisation ultérieure.

g. Préparation du sérum Hydra- LABSlime « HLS »

Le sérum est préparé à base d'EPS majoritairement et en utilisant d'autres ingrédients utilisés dans la préparation des sérums à usage cosmétique.

IV.1. Plan De Financement

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

a-Investissements initiaux

On berge 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.

Tableau de 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

Tableau de 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 :

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

Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide des bactéries lactiques

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

1 000 kg d'EPS peut établir environs 1000 ampoule pendant environs 10 jours.

$$\text{RT} = 1000 \times 3000 \text{DA (prix d'une seule ampoule)} = 3000000 \text{DA/ mois.}$$

Cout Totaux

<u>Désignation</u>	<u>Nombre/ quantité</u>	<u>Cout</u>
Matières premières	1000 L	Substrat bon marché « Lactosérum »
Main-d'œuvre directe	Deux laborantins et quatre agents polyvalents	- Salaire des Laborantins = $2 \times 35000 = 70000 / 2 = 35000$; - Salaire des agents polyvalents = $4 \times 20000 = 80000 / 2 = 40000$.
		Total 150 000 Da
<u>Frais de production :</u>		
- <u>Ethanol</u>	- 3000 L (pour 1000 L de milieu) ;	- Prix 1000 L : 150000 Da. ;
- <u>Emballage</u>	- Le sérum sera rempli dans des flacons en verre ;	- Prix par unité : 100 Da, soit 40000 Da pour 4000 ampoule.
Coûts totaux = 340000 Da		
<u>Dépenses totales</u>	- Electricité et gaz ; - Eau	150000 Da/ 6 = 25000 ; 40000/6 = 6600 .
Dépenses totales = 31600 Da		
<u>Bénéfice HLS / mois</u> = Revenus totaux - Coûts totaux - Dépenses totales.		
Soit		
$3000000 - 340000 - 31600 = 2628400 \text{ Da}$		
<u>Bénéfice HLS / mois</u> = 2628400 Da		
<u>Bénéfice HLS / année</u> = $25,71 \times 2628400 = 67576164 \text{ Da/ans}$		
25, 71 est calculé comme suit : $360/14$		

Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide des bactéries lactiques

Pour déterminer les bénéfices potentiels au cours des trois premières années De notre startup r »fabriquant de la gélatine pharmaceutique, il est important de prendre en compte plusieurs facteurs tels que les revenus prévus, les coûts de production, les investissements initiaux et les dépenses opérationnelles. Veuillez noter que ces chiffres sont hypothétiques et peuvent varier considérablement en fonction de la situation réelle du startup.

Investissements initiaux et les dépenses opérationnelles s'élèvent à **67576164 Da** pour la première année.

Revenu de la deuxième Année

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

$$3000000 + 3000000 \times 20/100 = \mathbf{3600000 \text{ Da/ans.}}$$

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 **380000 DA**.

Dépenses opérationnelles : les dépenses opérationnelles augmentent légèrement pour atteindre **35 000 DA**.

Bénéfice

Le bénéfice brut pour la deuxième année serait donc :

$$\mathbf{3600000 - 380000 - 35\ 000 = 3185000 \text{ Da / mois}}$$

soit

$$3185000 \times 25,71 = 113548215 \text{ Da/ ans.}$$

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 25 %, ce qui signifie des ventes de :

$$\mathbf{3800000 + (3800000 \times 25/100) = 4750000 \text{ Da/ mois.}}$$

Préparations cosmétiques à base d'exopolysaccharide des bactéries lactiques

La startup continue à innover pour rester compétitive, en introduisant de nouvelles fonctionnalités, en explorant de nouveaux marchés ou en développant de nouveaux produits.

Qui va augmenter les dépenses au même temps les couts de production.

La Production s'élèvent à **400000** DA et les dépenses **45000** DA.

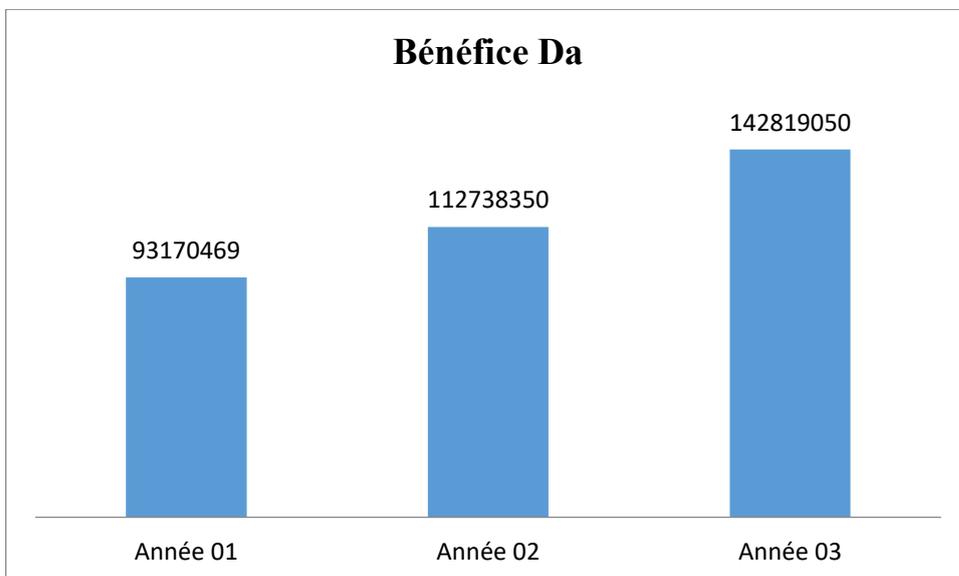
Le bénéfice de la troisième année serait de :

$$4750000 - 400000 - 45000 = 4305000 \text{ Da/ mois}$$

Soit

$$725000 \times 25.71 = 142819050 \text{ Da/ ans}$$

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



Evolution du bénéfice durant trois a

