

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE TLEMCEM-ABOU-BEKR BELKAID
FACULTE SNV/STU-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et immunologie



Mémoire

Présenté pour obtenir de grade
DE MASTER EN ALIMENTATION ET NUTRITION

Par

ABBOUYEN Fatima Zahra

Soutenu le

07/10/2014

Intitulé :

ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS PHENOLIQUE DE LA
FARINE DE LA PULPE DE CAROUBE PAR INTERACTION
PROBIOTIQUE-PREBIOTIQUE-PATHOGENE

JURY :

Mr ARIBI Mourad	Pr Président	Univ.Tlemcen
Mr MANSRI Ali	Pr Examineur	Univ. Tlemcen
Mr REBIAHI Sidi Mohammed	MCA Examineur	Univ.Tlemcen
Mme YUCEFI Fatema	MCA Encadreur	Univ.Tlemcen

Année universitaire : 2013/2014

RESUME

Introduction	La pulpe de caroube « <i>Ceratonia siliqua</i> » est utilisée dans différents secteurs notamment en industrie agroalimentaire, cosmétiques et pharmaceutique.
Objectif	étudier l'activité antimicrobienne de l'extrait phénolique de la farine de la pulpe de caroube.
But	Montrer l'effet bactéricide et antagoniste des polyphénols de la pulpe de caroube contre deux souches bactériennes.
Matériels et méthodes	des concentrations de polyphénols de pulpe de caroube allant de 5 à 50% ont été soumis aux mesures de leur capacité antimicrobienne contre un pathogène <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213, un probiotique <i>Lactobacillus rhamnosus</i> et une solution mixte (<i>S.aureus/Lb rhamnosus</i>).
Résultats	Une activité antimicrobienne importante pour des concentrations de polyphénols allant de 5 à 50% avec des zones d'inhibition de 10 à 18mm pour <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 et <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; et de 10 à 20mm pour la solution mixte (<i>S.aureus/Lb rhamnosus</i>).
Conclusion	Les polyphénols de la pulpe de caroube ont une forte activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes et lactiques aussi ont une synergie avec les probiotiques contre les bactéries pathogènes.
Mots clés	caroube, polyphénols, prébiotique, probiotique.

ABSTRACT

- Introduction** The carob pulp « *ceratonia siliqua* » is used in various industries including food processing, cosmetics and pharmaceuticals.
- Objectif** the antimicrobial study of the phenolic extract from the flour of carob pod
- Aim** Show the bactericidal and antagonist effect of phenolic extract from the flour of carob pod against two bacterial strains.
- Materials and methods** Concentration of polyphenols of carob pod going from 5 to 50% were subjected to the measures of their antimicrobial capacity against a pathogenic *Staphylococcus aureus* 29213, a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and a mixed solution (*S.aureus/Lb.rhamnosus*).
- Results** An antimicrobial activity important for concentrations of polyphenols going from 5 to 50% with inhibition zones from 10 to 18mm for *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Lactobacillus rhamnosus* ; and from 10 to 20mm for the mixed solution (*S.aureus/Lb.rhamnosus*).
- Conclusion** The polyphenols of carob pod have a strong antimicrobial activity against pathogenic and lactic bacteria also have a synergy with probiotic against the pathogenic bacteria.
- keywords** Carob, polyphenols, prebiotic, probiotic.

Avant-propos

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à madame YOUCFI Fatma mon encadreur, qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour sa patience, la liberté d'action qu'elle m'a l'aisée tout le long de ce projet, ses conseils scientifiques judicieux et la disposition inconditionnelle de tous ses moyens.

Je tiens à remercier professeur ARIBI Mourad pour m'avoir accepté au master II alimentation et nutrition et avoir accepté la présidence du jury de soutenance, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

J'exprime aussi mes remerciements pour les membres de jury qui ont daigné examiner ce projet :

- Mr MANSRI Ali professeur en chimie à l'université de Tlemcen.
- Mr REBIAHI Sidi Mohammed maître- conférences B à l'université de Tlemcen.

Je remercie Mr SELLES maître de conférences à l'université de Tlemcen de m'avoir permis de travailler au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier Mlle GHANEMI. FZ maître assistante à l'université de Tlemcen pour sa précieuse aide aussi à Melle BEN AHMED Meriem doctorante en microbiologie.

Je remercie l'ensemble des enseignants à qui revient le mérite de notre formation.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, sans eux ce travail n'aurait jamais pu être réalisé, à mes chères sœurs Khaoula, Soumia, Hayet, à mon fiancé Abd elillah, à mon cousin Amine, à mes amis Amine, Atika, Housseem, Nassima, Rhizelene, Sanaa et à tous les membres de ma famille et les personnes que j'estime.

TABLE DE MATIERES

Résumé	II
Abstract	III
Avant-propos	IV
Table de matières	V
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	VII
Liste des abréviations.....	IIX
Introduction	IX

Chapitre 1. Revue de la littérature

1. Présentation de la plante étudiée	1
1. Taxonomie.....	1
2. Biologie et reproduction.....	1
3. Origine et repartions géographique.....	2
4. Composition chimique de la caroube	5
5. Propriétés et utilisation	5
6. Production du caroubier.....	9
2. Les polyphénols végétaux	12
1. Introduction	12
2. Activités biologiques des polyphénols.....	12
3. Structure chimiques des polyphénols	14
4. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux	20
5. Caractéristiques des polyphénols de la caroube.....	22
6. Effet antibactériens et antifongiques des composés phénoliques.....	23
3. Les bactéries lactiques et les prébiotiques.....	24
1. Définition.....	24
2. Les différentes familles prébiotiques	25
3. La différence entre les prébiotiques et les probiotiques	27
4. Aspect règlementaire des prébiotiques.....	28
5. Mécanisme d'action des prébiotiques.....	29
6. Effet bénéfique des prébiotiques sur la santé	29
7. Les prébiotiques dans l'alimentation des nourrissons	31
8. La farine de la gousse de caroube FCP	33
9. Les bactéries lactiques	

Chapitre2. Matériel et méthodes

1. Objectif.....	41
2. Les souches pathogènes.....	41
3. Préparation de matériel végétal	41
4. Extraction des phénols totaux	42
5. Milieu de culture et condition de croissance	42
6. Etude de l'évolution de la cinétique de croissance et de production	42
7. Méthode de puits ADT	43
8. Concentration minimale inhibitrice (micro-dilutions).....	45
9. Dosage de polyphénols par chromatographie couche mince.....	45

Chapitre 3. Résultats et discussions

1. La cinétique de croissance bactérienne	47
2. Dénombrement des souches.....	47
3. Démonstration du pouvoir antibactérien des polyphénols.....	49
4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	53
5. Dosage des polyphénols par chromatographie sur couche mince.....	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58
Bibliographie.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde.....	3
Figure 02 Répartition du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques.....	4
Figure 03 Distribution du caroubier à tlemcen.....	4
Figure 04 pulpe et farine de caroube apres elimination des sucres.....	4
Figure 05 : les grains de la caroube.....	7
Figure 06 superficie occupée par le caroubier.....	10
Figure07 : production mondiale de caroube.....	11
FIGURE08 : structure chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique.....	14
Figure 09 : structure chimiques de quelques stilbènes.....	14
Figure 10 : structure chimiques de quelques flavonols.....	15
Figure 11 : structure chimiques de quelques anthocyanidines.....	16
Figure 12 : Structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés.....	17
Figure 13 : Structure de l'(-)-épicatechique-3-O-gallate.....	17
Figure 14 : Structure chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.....	19
Figure 15 : Structure chimique des proanthocyanidines avec le phloroglucine.....	19
Figure 16 : Catéchine-(4 α \rightarrow 2 -phloroglucine.....	20
Figure 17 : les mécanismes d'action des prébiotiques.....	29
Figure 18 : présentation du matériel biologique utilisé (gousse, grains, pulpe, farine).....	41
Figure 19 : le schéma de test de l'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test).....	44
Figure 20 : photo représentative de dénombrement de la solution mère de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 à 4heures	47
Figures 21 : photo représentative de dénombrement de la solution mère de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> à 4heures.....	47
Figure 22 : étude de la cinétique microbienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29312 durant 24 heures.....	48
Figure 23 : étude de la cinétique microbienne <i>Lactobacillus rhamnosus</i> durant 24 heures.....	48

Figure 24 : photos représentatives d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les différentes concentrations des polyphénols.....	49
Figure 25 : diamètre de zones d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> en mm en fonction des concentrations des polyphénols.....	50
Figure 26 : diamètre des zones d'inhibition de <i>Lb.rhamnosus</i> en mm en fonction des concentration des polyphénols.....	51
Figure 27 : photos représentatives d'inhibition de <i>Lb.rhamnosus</i> par les différentes concentrations des polyphénols.....	51
Figure 28 : diamètre des zones d'inhibition de <i>S.aureus</i> et <i>Lb.rhamnosus</i> en mm en fonction des concentration des polyphénols.....	52
Figure 29 : photos representatives d'inhibition d'une culture mixte de <i>S.aureus</i> et <i>Lb.rhamnosus</i> par les différentes concentrations des polyphénols.....	53
Figure 30 : la concentration minimale inhibitrice de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 et <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pour une durée d'incubation de 24h à 37°C.....	54
Figure 31 : résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques de la farine de pulpe de caroube.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de caroubier	1
Tableau.2 : composition moyenne de la pulpe de caroube.....	6
Tableau.3 : superficie occupée par le caroubier.....	10
Tableau 4 : production mondiale de caroube	10
Tableau 5 : activités biologique des composés polyphénoliques	13
Tableau 6 : classes de proanthocyanides.....	17
Tableau 7 : Les principales classes des composés antimicrobiens des végétaux.....	20
Tableau 08 : proposition de criteres de selection des prébiotiques intestinale.....	28
Tableau 09 : effets positifs des prébiotiques sur la santé.....	32
Tableau 10 : principaux microorganismes utilisés comme agents probiotiques.....	40
Tableau 11 : nature de l'origine de différentes souches pathogènes utilisées.....	41
Tableau 12 : resultats de la CMI des extraits phénoliques vis-à-vis les deux souches bacteriennes.....	54
Tableau 13 : rapports frontaux en fonction des standards.....	57

LISTE DES ABREVEATIONS

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

Lb.rhamnosus : *Lactobacillus rhamnosus*

E.coli : *Escherichia coli*

K.pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

B.cereus : *Lactobacillus cereus*

MH : muller hinton

BHI : Brain – heart – infusion

MRS : Man Rogosa Sharpe

UGCAA : union générale des commerçants et artisans algériens

ANRH : Agence Nationale des Ressources Hydrauliques

FOA : food and agriculture organization of the united nation

GOS : galacto oligosaccharide

FOS : fructo oligosaccharide

GI : gastro intestinal

IgA : immunoglobulines A

OGM : organisme génétiquement modifié

AGCC : acide gras a chaine courte

FPC : farine de pulpe de caroube

G : guanine

C : cytosine

ADH : arginine dihydrolase

GPA : glycéraldéhyde phosphatase

WHO : world health organization

DO : densité optique

ADT : agar well diffusion

UFC : unité forme colonie

Zi : zone d'inhibition

CMI : concentration minimal inhibitrice

CCM : chromatographie couche mince

RF : rapport frontale

ATCC : American Type Culture Collection

R : répétition

I. Présentation de la plante étudiée

1. Taxonomie

Scientifiquement, le caroubier est appelé *Ceratoniasiliqua*. Ce nom dérive du grec keras et du latin siliqua où gousse, faisant allusion à la forme de son fruit qui ressemble à la ‘corne’ de bouc (Bolonos., 1955). Le mot "caroubier" venant de l'arabe al kharroube, est connu sous le nom scientifique de *Ceratoniasiliqua*L.(Boudy., 1950).

Il est aussi appelé Carouge, Pain de saint Jean-Baptiste, figuier d'Egypte, fève de Pythagore (Batlle et al., 1997). Pendant longtemps aux joailliers comme unité de poids pour peser les diamants, les perles et d'autres pierres précieuses (1 carras = 205,3 mg) (Rajeb., 1995).

Tableau 01 : Classification de caroubier (Quezel et Santa., 1962).

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheobionta
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabalae
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Ceratonia</i>
Espèce	<i>Ceratoniasiliqua</i> L

2. Biologie et reproduction

Le caroubier est une espèce dioïque dont les fleurs sont initialement bisexuelles puis deviennent habituellement unisexuées au cours du développement floral (Thomas et Metha., 1983).

Cet aspect a été bien étudié par (Schroeder., 1959); il est considéré comme le seul arbre méditerranéen qui fleurisse en été : d'août à octobre (Aafi., 1996) ou en automne : de Septembre à novembre (Fournier., 1977). Cependant, le temps et la durée de la période de floraison dépendent des conditions climatiques, ce qui est le cas pour la plupart des arbres fruitiers (Batlle et al., 1997).

La pollinisation des fleurs du caroubier est en grande partie assurée par les insectes (Retana *et al.*, 1990, 1994; Rejeb *et al.*, 1991 et Ortiz *et al.*, 1996) mais aussi par le vent (Passos de Carvalho., 1988 et Batlle *et al.*, 1990). Les fleurs sécrètent des substances nectarifères dont la quantité et la contenance en sucre sont élevées dans la fleur femelle par rapport à son homologue mâle (Ortiz *et al.*, 1996).

La fructification, chez le caroubier, se situe entre juillet et décembre de l'année qui suit la floraison, selon les régions et les cultivars (Aafi., 1996).

3. Origine et répartition géographique

3.1. Origine

L'origine du caroubier demeure aberrante. Toutefois, De (Candolle., 1983 et Vavilov., 1951) ont rapporté qu'il serait native de la région Est méditerranéenne (Turquie et Syrie).

Pour certaines auteurs le caroubier est domestiqué depuis le néolithique 4000 ans avant J.C, et sa culture extensive date au moins de 200 ans avant J.C (Batlle *et al.*, 1997 ; Gharnit., 2003 et Berrougui., 2007). Il était connu dans le proche Orient et les îles de la méditerranée. En Egypte les pharaons ont utilisé la farine du fruit pour rigidifier les bandelettes des momies (XVII^e siècle avant J.C). Les Numides s'en servaient pour l'alimentation des bêtes de valeur et, selon Gsell, il entrait dans la préparation de la nourriture humaine (Lavallée., 1962).

Au Moyen-Âge, le caroubier donnait lieu à un commerce important entre les provinces du Midi et du Nord, les Etats Germaniques et la Grande-Bretagne. Son bois était employé dans l'ébénisterie de l'époque et son fruit servait à la préparation des confitures (Lavallée., 1962).

3.2. Répartition géographique

Selon (Hillcoat *et al.*, 1980) le caroubier est étendu, à l'état sauvage, en Turquie, Chypre, Syrie, Liban, Palestine, Sud de Jordanie, Egypte, Arabie, Tunisie et Libye avant d'atteindre l'Ouest de la méditerranéen.

Il a été disséminé par les arabes le long de la côte Nord de l'Afrique, au Sud et à l'Est de l'Espagne et par les grecs en Grèce et en Italie. Dès lors, il a été diffusé au Sud du Portugal et au Sud-est de France (Konate., 2007). Ensuite il a été introduit avec succès dans des pays ayant un climat méditerranéen : en Amérique du Sud, du Nord et en Australie par les

Espagnols. Actuellement le caroubier se trouve aussi aux Philippines, en Iran, en Afrique du sud et en Inde (Berrougui., 2007).



Figure 01 : Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et al, 1997)

En Algérie, le caroubier est fréquemment cultivé dans l'Atlas Saharien et il est commun dans le tell (Quezel et santa., 1963). On le trouve à l'état naturel en association avec l'amandier, *Olea Europea* et *Pistacia Atlantica* dans les étages semi-arides chauds, subhumides, avec une altitude allant de 100m à 1300m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée ; avec une température de 5°C jusqu'à 20°C et une pluviométrie de 80 mm à 600 mm/an (Rebour., 1968).

Suivant ces critères climatiques ; on a établi l'aire de répartition du caroubier en Algérie (figure 02). Ses lieux de prédilection sont les collines bien ensoleillées des régions littorales ou sublittorales : Sahel algérois, Dahra, Grande-Kabylie et Petite-Kabylie, vallée de la Sommam (1074 ha) et de l'Oued-Isser, collines d'Oran et des coteaux Mostaganem à étage semi-aride chaud, plaines de Bône, Mitidja et les vallées intérieures (1054 ha). Il descend jusqu'à Bou-Saâda, mais n'y porte pas de fruit, et dans la zone de Traras au Nord de Tlemcen (276 ha) (Lavallée., 1962 ; Zitouni., 2010).

A Tlemcen, on trouve le caroubier dans les régions suivantes : Sidi M' djahed, Sabra, Henaya, Tlemcen, Ain Tellout, Sidi Abdli, Remchi, Ben Sekran, Ain Youcef et de Beni Saf jusqu'à Marsat Ben M' hidi (Figure 03).

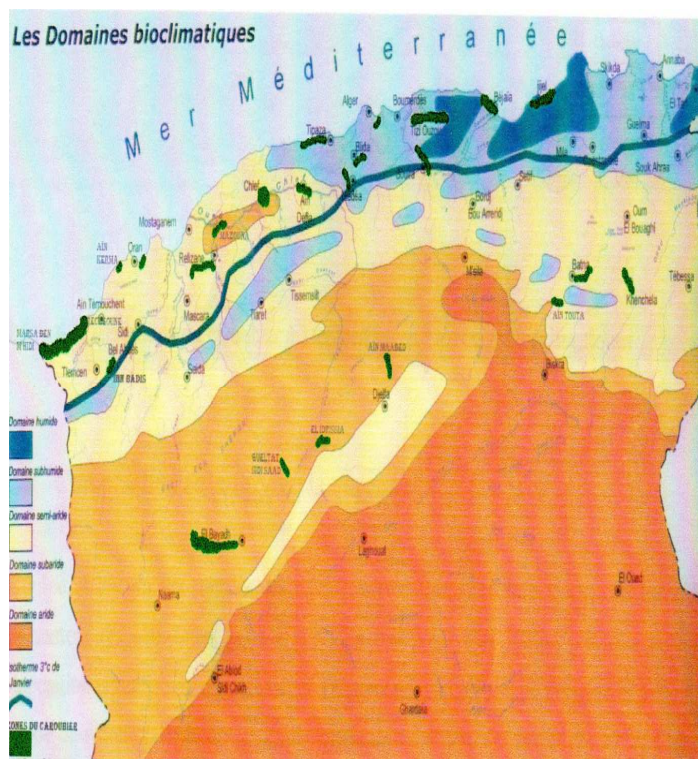


Figure 02 : Répartition du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques (A.N.R.H, 2004)

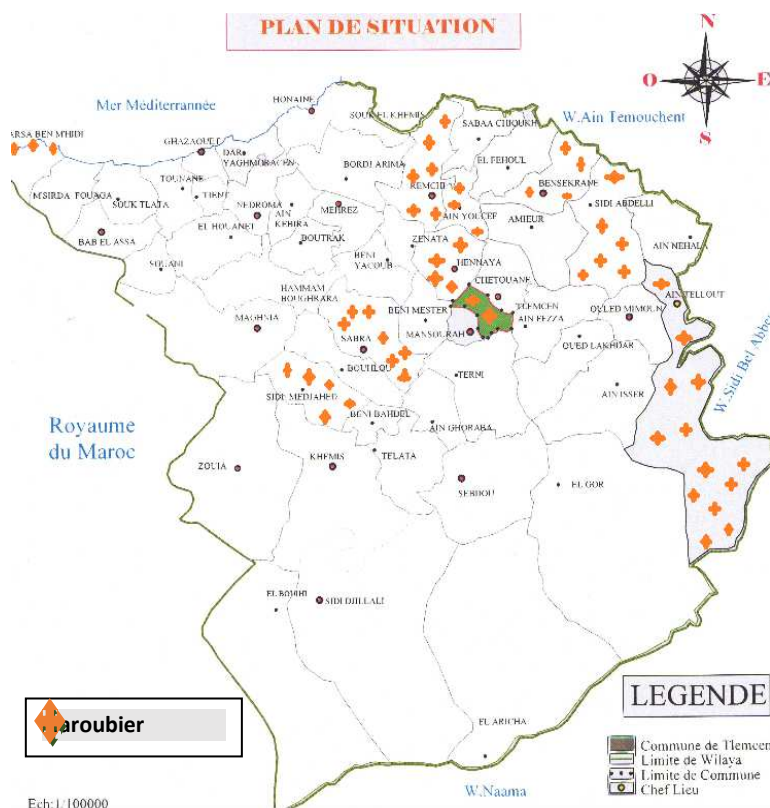


Figure 03 : Distribution du caroubier à Tlemcen

4. composition chimique de la caroube

La composition chimique de la graine a été évaluée par (Bouzouita et al., 2007), qui a démontré que la graine était pauvre en minéraux et en fibres et la pulpe et les graines sont les deux principaux constituants de la gousse du caroubier et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. Selon plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe dépend en général, du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (Orphanos et Papaconstantinou., 1969; Vardar et al., 1972; Calixto et Cañellas., 1982 et Albanell et al., 1991).

Selon les travaux de (Avallone et al., 1997 et Bengoechea et al., 2008), la gousse de caroube est riche en hydrates de carbone et en fibres, elle contient une faible quantité de protéines et des teneurs négligeables en lipides ; quant à la teneur de la caroube en minéraux elle est appréciable.

5. propriétés et utilisation

5.1. Propriétés

La pulpe est très utilisée soit comme aliment diététique, soit comme remplaçant du chocolat ou encore en alimentation animale. Elle est très riche en sucre (48-56%), en particulier, sucrose, glucose, fructose et maltose (**Tableau 02**), mais pauvre en protéines (2-6%) et en lipides (0.4-0.6%) dont les acides saturés et insaturés sont en proportions égales (**Leroy., 1929 et Puhan et Wieling., 1996**). A partir d'extrait de gousses, cinq acides aminés, alanine, glycine, leucine, proline et valine, ont été isolés par (**Vardar et al., 1972**) et deux autres composés, tyrosine et phénylamine, ont été rapporté par (**Charalambous et paconstantinou., 1966**). En plus, la pulpe présente également une teneur très élevée en fibres (27-50%) et une quantité non négligeable en tanins (18-20%) (**Saura-Calixto., 1987; Puhan et Wielinga., 1996**). Par ailleurs, l'analyse minéralogique faite, par (**Puhan et wielinga., 1996**), sur la pulpe, a révélé une composition (en mg/100g de pulpe) de : K= 1100, Ca= 307, Mg= 42, Na= 13, Cu= 0.23, Fe= 104, Mn= 0.4, Zn= 0.59.

Tableau 02 : Composition moyenne de la pulpe de caroube (**Puhan et Wielinga., 1996; Batlle et al., 1997**)

Constituants	%
Sucres totaux	48 – 56
Sucrose	32 – 38
Glucose	5 – 6
Fructose	5 – 7
Pintol	5 – 7
Tannins	18 – 20
polysaccharides non amines	18
Cendre	2 – 3
Lipides	0,2 – 0,6



Figure 04 : Pulpe et farine brute de caroube après élimination des sucres.

La graine est composée de 30 à 33% d'enveloppe tégumentaire, de 42 à 46% de l'albumen et de 23 à 25% d'embryon (Neukom., 1988). L'enveloppe tégumentaire est considérée comme étant une source naturelle pour la production de polyphénol antioxydant (Batista et al., 1996; Makris et Keflas., 2004). L'albumine est essentiellement constituée de gomme ou galactomannane, qui est une molécule polysaccharidique composée de deux unités de sucre, mannose et galactose, à une proportion de **4:1**.

Ce polysaccharide naturel est doté de diverses propriétés importantes, à savoir une haute viscosité dans l'eau, même à température et à pH variables (García-Ochao et Casas., 1992), une capacité de former à partir d'une solution très diluée de stable solution visqueuse et une haute potentialité de réagir avec d'autres polysaccharides induisant ainsi un effet de synergie. (Puhan et Wielinga., 1996).

La valeur nutritionnelle de la gousse du caroubier est considérée similaire à celle de la plupart de céréales (Coit., 1962; NAS., 1979). Selon (Noblet et al., 1989), la valeur d'énergie métabolique (EM) de la farine de caroube est estimée à 13.1mj EM/kg de produit frais.



Figure 05 : les grains de la caroube

5.1.1. Utilisation du caroubier :

Le caroubier se présente comme une essence à la fois forestière et arboricole. Il est d'une grande importance économique, écologique et sociale. Son utilisation est multiple.

- Arbre

Il est utilisé pour le reboisement et la reforestation des zones affectées par l'érosion et la désertification (Boudy., 1950; Rejeb *et al.*, 1991 ; Biner *et al.*, 2007). Il est également utilisé comme plante ornementale en bordure des routes et dans les jardins. (Batlle *et al.*, 1997).

Actuellement, il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers les plus performants puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont utiles et ont des valeurs dans plusieurs domaines. (Aafi., 1996).

- Fruit

Le fruit du caroubier ou la caroube, se compose d'une pulpe enveloppant des graines régulières. En effet la pulpe sucrée de la caroube est employée depuis longtemps comme nourriture de bétail à côté d'autres aliments comme la farine d'orge (Ait Chitt *et al.*, 2007).

Selon les travaux de (Lizardo *et al.*, 2002), il semblerait que la farine de caroube soit un produit parfaitement adapté à l'alimentation des porcelets. Son incorporation dans les régimes s'avère très utile dans le soutien de la consommation, de la croissance et de la santé en post-sevrage.

La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée surtout en agro-alimentaire (Sbay et Abourouh., 2006) dans la préparation de jus sucrés, de chocolat, de biscuits et comme remplaçant de cacao (Berrougui., 2007).

En Egypte, on extrait des fruits un sirop qui est employé pour confire les fruits ; les Arabes fabriquent avec la pulpe une boisson alcoolisée et les Kabyles fabriquent à partir du fruit un plat appelé tomina (Bonnier., 1990).

De nombreuses études cliniques ont souligné l'efficacité de la poudre de caroube dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles (Se rairi et al., 2000), ce qui a été confirmé par l'étude clinique menée par (Loeb et al., 1989) chez des enfants âgés de 3 à 21 mois, que le transit intestinal, la température et le poids de l'enfant s'amélioreraient plus vite après administration de la poudre de caroube par voie orale. Selon (Rejeb., 1995) la pulpe est recommandée contre la tuberculose pulmonaire et les infections des bronches. Étant riche en antioxydants (composés phénoliques), en sucres, protéines, fibres, potassium et calcium, cette plante est connue en thérapeutique pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, anti diarrhéique et troubles digestifs (Berrougui., 2007).

D'autres études expérimentales ont démontré les capacités bactéricides de la pulpe de caroube vis-à-vis de staphylococcus aureus ; la caroube adsorberait aussi les entéro-toxines produites par certaines souches d'*Escherichia coli* et de staphylocoques ainsi que par le vibriocholérique, ce mécanisme d'adsorption pourrait être expliqué par la présence de tanins dans la partie insoluble et active de la caroube (Tolentino., 1950).

En plus de son pouvoir nématocide démontré par les travaux de (El Allagui et al., 2007) qui est dû à sa teneur en composés phénoliques, la caroube possède aussi une activité antimicrobienne et antioxydante selon (Ben Hsouna et al., 1986).

Selon l'étude récente de (Sanchez et al., 2010) la caroube est une source bon marché d'hydrates de carbone pour la production de bioéthanol.

Quant aux graines de caroube, vu leur uniformité, elles sont appelées 'carats' et ont servi pendant longtemps aux joailliers comme unité de poids pour peser les diamants, les perles et d'autres pierres précieuses (1 carat = 205,3 mg) (Rejeb., 1995).

- Les autres parties de l'arbre

Les autres parties de l'arbre sont aussi exploitées ; en effet, la fleur est utilisée par les apiculteurs pour la production du miel de caroube, alors que les feuilles sont utiles pour l'alimentation des animaux. L'écorce et les racines sont utilisées en tannerie grâce à leur teneur en tanins. Le bois du caroubier, dur, de couleur rouge, est estimé dans la charbonnerie et la menuiserie (Hariri et al., 2009).

Dans les domaines forestiers, les pieds mâles sont souvent taillés pour le fourrage. Plusieurs études ont montré que l'utilisation des feuilles associées avec le polyéthylène glycol (PEG) améliore la digestibilité et la qualité nutritive des tanins contenus dans les feuilles (Priolo et al., 2000), ces derniers ont été utilisés en Turquie, dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique (Baytop., 1984); ils ont été également désignés comme étant porteurs d'activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Kivçak et Mart., 2002).

5.2. Production du caroubier

Selon les données du (FAOSTAT., 2010), l'aire totale de la production mondiale du caroubier est estimée à 102939 ha (Tableau 03). La plus grande superficie, 83574 ha, est celle de l'Europe, contre une superficie estimée à 1000 ha pour l'Algérie et 13460 ha pour les pays d'Afrique du Nord.

Tableau 03 :Superficie occupée par le caroubier (FAOSTAT., 2010)

Pays	Superficie (ha) en 2004	Superficie (ha) en 2008
Algérie	1066	1000
Afrique du Nord	13526	13460
Europe	92218	83574
Monde	112711	102939

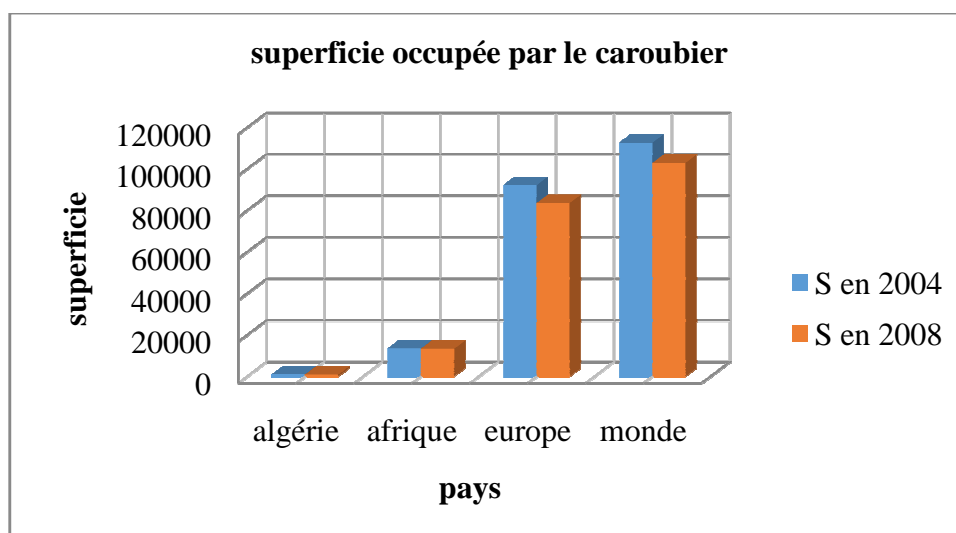


Figure 06 : superficie occupée par le caroubier

Tableau 4 : Production mondiale de caroube (FAOSTAT., 2010)

Pays	Production en tonnes (2004)	Production en tonnes (2008)
Espagne	67000	72000
Italie	24000	31224
Maroc	40000	25000
Portugal	20000	23000
Grèce	19000	15000
Turquie	14000	12100
Chypre	7000	3915
Algérie	4600	3600
Liban	3200	2800
Tunisie	1000	1000
Monde	182680	191167

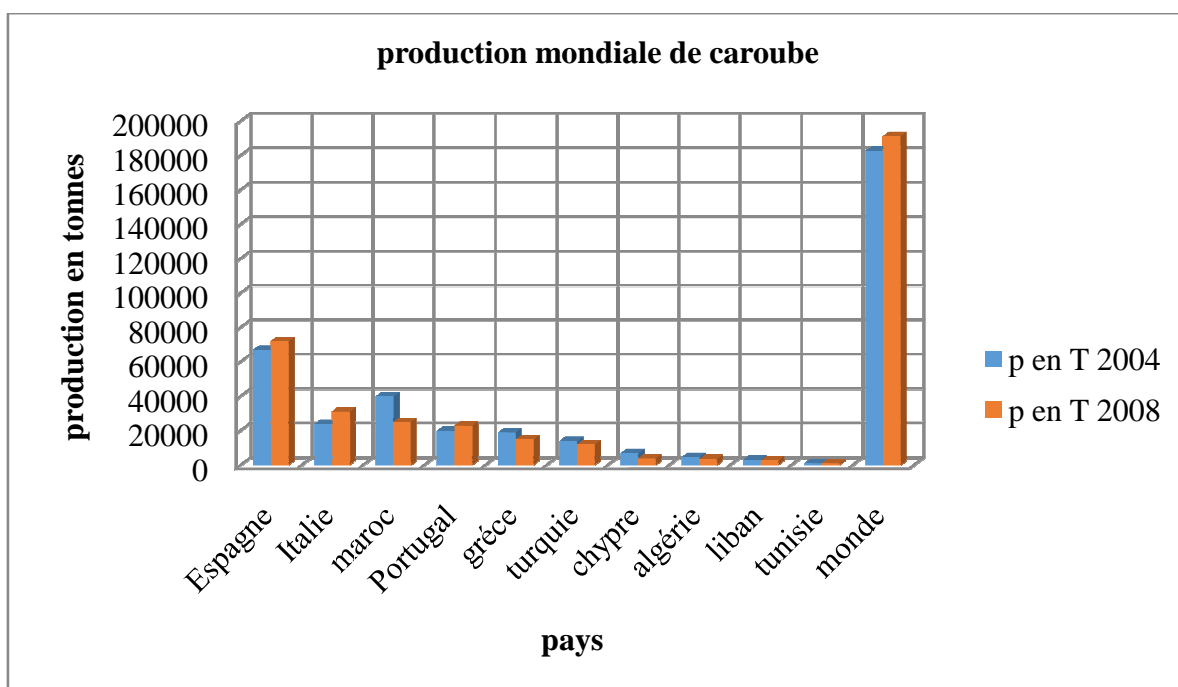


Figure 07 : production mondiale de caroube

Durant le siècle dernier, la production mondiale de caroube a connu une chute dramatique, elle est passée de 650.000 t en 1945 ([Orphanos et Papaconstantinou., 1969](#)) à 310.000 t en 1997.

La grande perte a été enregistrée en Espagne où la production a chuté de 400.000 t en 1930 à 150.000 t en 1990 ([MAPA., 1994](#)).

Selon ([Batlle., 1997](#)), la régression accusée dans la production du caroubier a été principalement liée à la baisse des prix et aux programmes du développement des zones côtières au dépend des plantations de caroubier.

On remarque qu'en Algérie la production de caroube ainsi que la surface cultivée ont baissé par rapport aux données enregistrées en 2004, car il n'est plus utilisé comme plante fourragère pour l'aliment de bétails au profit de l'orge et c'est dû à son coût élevé et son rendement lent (10 à 15 ans après sa plantation).

II. Les polyphénols Végétaux

1. Introduction

Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les organismes pathogènes, bactéries ou virus qui infectent la plante. Souvent présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores, ils limitent leur appétence et digestibilité. Ils ont donc été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent que nous leur portons aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés anti-oxydantes et de leurs effets présumés sur la santé.

Les recherches sur les effets thérapeutiques des polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments, réparties en plusieurs classes. Nous pouvons citer parmi les plus importantes les anthocyanes ([Scalbert et Williamson., 2000](#)) responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins ([Didry et al., 1982](#)) responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair de kaki, etc.), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondantes dans l'orange. Pour les légumes, nous citons l'oignon riche en flavonols (quercétine).

2. Activités biologiques des polyphénols

Les orientations récentes des recherches sur les polyphénols visent à mieux comprendre les mécanismes d'action au niveau moléculaire. Les résultats des études sur les marqueurs du stress oxydant sont très contradictoires et ne progresseront qu'à la lumière des progrès réalisés dans la validation de ces marqueurs. Trop peu d'études cliniques ont encore été publiées mais elles suggèrent un rôle protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires.

Les recherches épidémiologiques visant à préciser les associations entre les niveaux de consommation des divers polyphénols et le risque de développer les pathologies permettront de préciser la nature des polyphénols et les niveaux d'apports les plus favorables à la prévention des diverses pathologies.

Ces études épidémiologiques sont encore à leurs balbutiements. Les progrès sont rendus difficiles par l'insuffisance des tables de compositions alimentaires pour les polyphénols.

Une première table partielle vient d'être publiée aux Etats-Unis. Une autre table plus complète est en cours d'élaboration en France.

Le développement de tels outils contribuera à préciser les associations entre consommation de polyphénols et santé, une des clés nécessaires pour l'établissement de recommandations nutritionnelles.

Dans l'état des connaissances actuelles, il est illusoire de recommander une augmentation des niveaux d'apports en polyphénols. Un apport excessif en polyphénols à travers notamment la consommation de suppléments nutritionnels pourrait avoir éventuellement des conséquences fâcheuses pour la santé (statut en fer, effets pro-oxydants, effets goitrogènes, etc...). Seuls les recherches à venir permettront de mieux préciser les niveaux d'apport les plus favorables au maintien de la santé (Didry et al., 1982).

Tableau 5 : Activités biologique des composés polyphénoliques.

Polyphénols	activités	Références
Acides phénol	Anti-bactériennes	(Ravn et al., 1984)
Anti-fongiques	(Hayaseet Kato., 1984)	
Anti-oxydantes	(Mabry et Ulubelen., 1998)	
Coumarines	Protectrices vasculaires et	(Stavric et Matula., 1992)
Anti-œdémateuses		
Anti-tumorales	(Das et al., 1994)	
Anti-carcinogènes	(Bidet et al., 1987)	
Flavonoïdes	Anti-inflammatoires	(Bruneton., 1993)
Hypotenseurs et diurétiques	(Aruoma., 1995)	
Anti-oxydantes	(Masquelier et al., 1979)	
Effets stabilisants sur le collagène	(Bahorun et al., 1996)	
Anti-oxydantes	(De Oliveira et al., 1972)	
Proanthocyanid	Anti-tumorales	(Brownléé et al., 1992)
Anti-fongiques	(Kreofsky et al., 1992)	
Anti-inflammatoires	(Okuda et al., 1983)	
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	(Okamura et al., 1993)
Tanins galliques	Anti-oxydantes	(Huglin et Schneider., 1998)
et catéchiques		

3. Structure chimiques des polyphénols

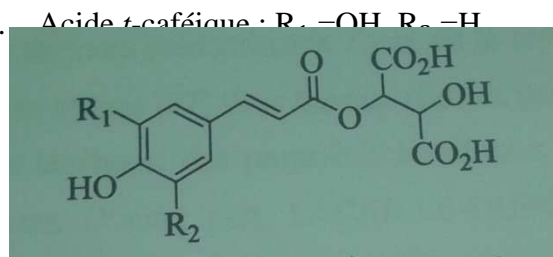
3.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette «flavone».

- Les acides phénoliques

Nous distinguons tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine.

D'autres composés phénoliques appartiennent également à cette classe de composées. A titre d'exemple, nous citons les dérivés hydroxycinnamique possédant une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique l'acide *t*-caféique, l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique (Huglin et Schneider., 1998 et Goetz et al., 1999).

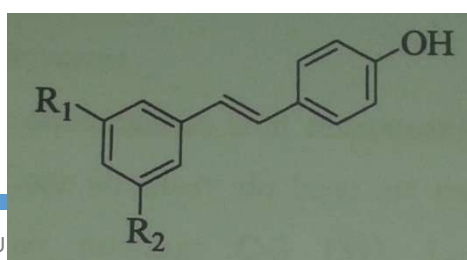


Acide *t*-fertarique : $R_1 = -OCH_3, R_2 = -H$

Figure 8 : Structure chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique

- Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénolique contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosyle : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol*trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine(Waterhouse et Lamuela-Reventos., 1994 et Langcake., 1981).



Pterostilbènes : $R_1 = -OCH_3, R_2 = -OCH_3$
 Resvératrol : $R_1 = -OH, R_2 = -OH$
 Picéide : $R_1 = -OGlc, R_2 = -OH$

Figure 9 : Structure chimiques de quelques stilbènes.

Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques jusqu'à pentamériques (Bokel *et al.*, 1988 et Tanaka *et al.*, 1998). Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). D'après les travaux de FRANKEL et coll. (Frankel *et al.*, 1993), ils pourraient jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires. D'autre part, JANG et coll. (Jang *et al.*, 1997) leur attribue des activités chimio-préventives contre le cancer.

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl benzopyrone.

Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Bourzeix *et al.*, 1986).

- **Les flavonols**

Les flavonoïdes sont des substances naturelles polyphénolique très répandues dans le règne végétal et donc dans les produits de notre alimentation. Nous citons à titre d'exemples le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges (Remy., 1999). Des travaux réalisés par Bohm et coll (Bohm *et al.*, 1998) et par Vinson et coll (Vinson *et al.*, 1995) leur attribuent des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancrs. D'autre part, Lacaille-dubois et coll (Lacaille-Dubois et Wagner., 1996) ont montré que ces composés possèdent aussi des activités antitumorales et chimio-préventives.

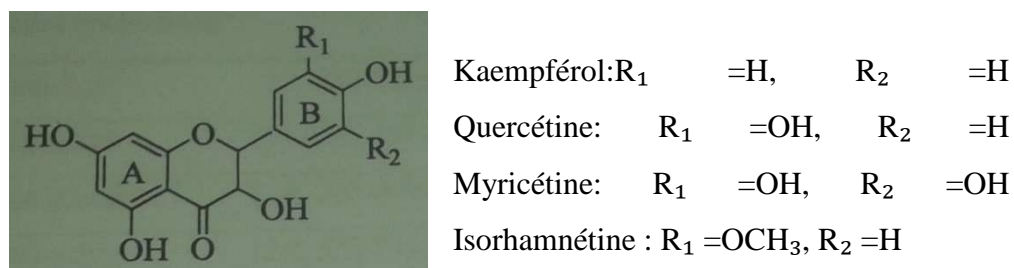


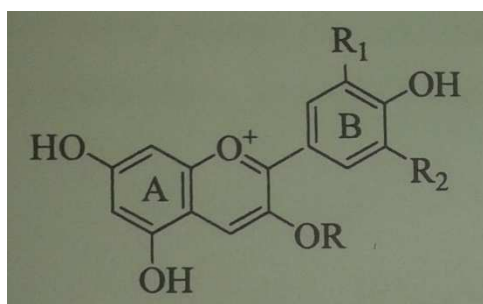
Figure 10 : Structure chimiques de quelques flavonols

- **Les anthocyanes**

Les anthocyanes sont responsables de la coloration rouge des racines de l'*Arbutus unedo* L. Leur structure de base est caractérisée par un noyau «flavone» généralement glucosylé en position C-3 (Ribereau-Gayon., 1968). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule.

L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

Nous distinguons cinq anthocyanidine : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine.



Malvidine : $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OCH}_3$

Péonidine : $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$

Delphinidine : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}$

Pétunidine : $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$

Cyanidine : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$

Figure 11 : Structure chimiques de quelques anthocyanidines.

- **Les tanins condensés (flavon-3-ols)**

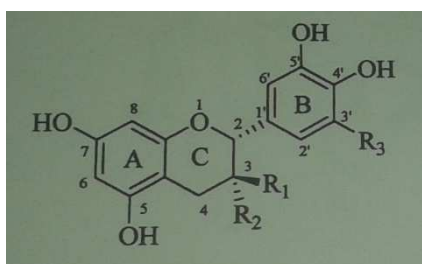
Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, thé, etc.) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles de nos produits de consommation (Haslam., 1998 et Haslam., 1980). Dans l'*Arbutus unedo* L. Les racines, tiges et fruits sont les zones de concentration des tanins et des composés phénolique (Escribo-Bailon et al., 1992 et Souquet et al., 1996). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylès (Hemingway., 1992).

Tableau 6 : Classes de proanthocyanidines.

Classes de	Unité monomérique	Substituants			
		5	7	3'	4'
Proanthocyanidines		5	7	3'	4'
5'					
Procyanidine	(2R,3S)-Catéchine	OH	OHOHOH	H	
Prodéphinine	(+)-(2R,3S)-Gallocatéchine	OH	OHOHOHOH		
Propélargonidine	(2R,3S)-Afzélíchole	OH OH	H OH	H	
Profisetidine	(2R,3S)-Fisetinidole	H	OH	OHOH	H

- *Les unités monomériques*

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. Nous distinguons ainsi les catéchines (dihydroxylées) et des gallocatéchines (trihydroxylées).



(+)-(2R,3S)-Catéchine : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$

(-)-(2R,3S)-Épicatéchine : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$

(+)-(2R,3S)-Gallocatéchine : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

(-)-(2R,3S)-Épigallocatéchine: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}$

Figure 12 : Structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier dans l'(-)-épicatéchine, formant l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate (Su et Singleton., 2001 et Boukharta et al., 1988).

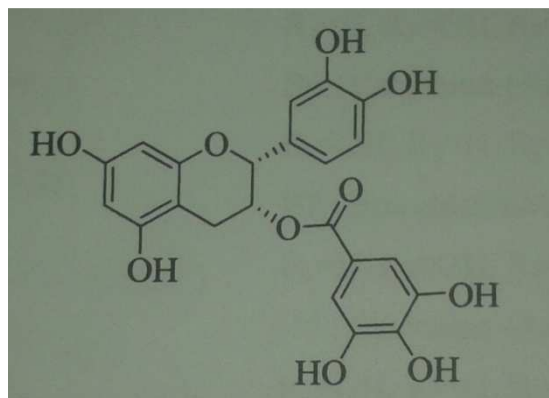
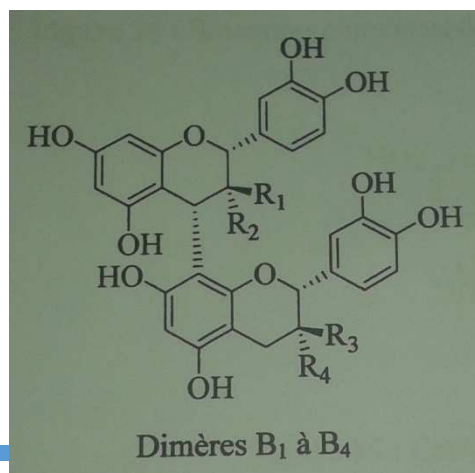


Figure 13 : Structure de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate.

- **Tanins condensés (type A et B)**

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison inter-monomérique ([Bate-Smith., 1954 et Porter et al., 1986](#)).

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unité monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées ([Weinges et Piretti., 1971 ; Czochanska et al., 1979 et Ricardo-da-Silva et al., 1991](#)). Le type B se caractérise par une liaison inter-monomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (R), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B sont représentées dans la figure 13. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A ([Escribo-Bailon et al., 1992](#)).



B1 : Epicatéchine-(4β→8)-catéchine

R₁ =H, R₂ =OH, R₃ =OH, R₄ =H

B2 : Epicatéchine-(4β→8)-épicatéchine

R₁ =H, R₂ =OH, R₃ =H, R₄ =OH

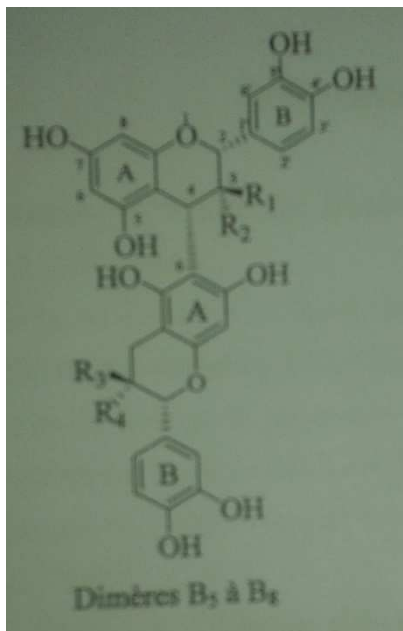
B3 : Catéchine-(4α→8)-catéchine

R₁ =OH, R₂ =H, R₃ =OH, R₄ =H

B4 : Catéchine-(4 α →8)- épicatechine

R₁ =OH, R₂ =H, R₃=H, R₄ =OH

Dimères B₁ à B₄



B5:Epicatechine-(4 β →6)-épicatechine

R₁ =H, R₂ =OH, R₃ =H, R₄ =OH

B6 : Catéchine-(4 α →6)-catéchine

R₁ =OH, R₂ =H, R₃ =OH, R₄ =H

B7 : Epicatechine-(4 β →6)-catéchine

R₁ =H, R₂ =OH, R₃ =OH, R₄ =H

B8 : Catéchine-(4 α →6)-épicatechine

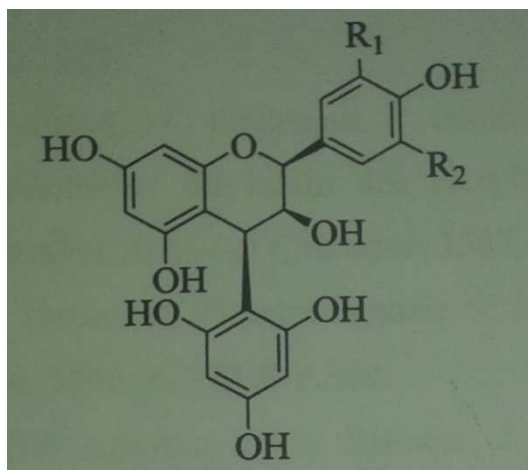
R₁ =OH, R₂ =H, R₃ =H, R₄ =OH

Dimères B₅ à B₈

Figure 14 : structure chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.

- *Dérivés du phloroglucinole*

Les travaux de Bruyne et coll. (de Bruyne et al., 1999) ainsi que ceux de Porter et coll. (Porter et al., 1989) ont montré qu'un autre type de proanthocyanidines sont présents dans le règne végétal. Nous citons à titre d'exemples l'épicatechine-(4 β →2)-phloroglucinole, l'épigallocatechine-(4 β →2)- phloroglucinole etc.



Epicatechine-(4 β →2)-phloroglucinole : R₁

=OH, R₂ =HEpigallocatechine-(4 β →2)-
phloroglucinole :

R₁ =OH, R₂ =OHEpiazféliche-(4 β →2)-
phloroglucinole :

R₁ =H, R₂ =H

Figure 15 : Structure chimiques des

proanthocyanidines avec le phloroglucinole.

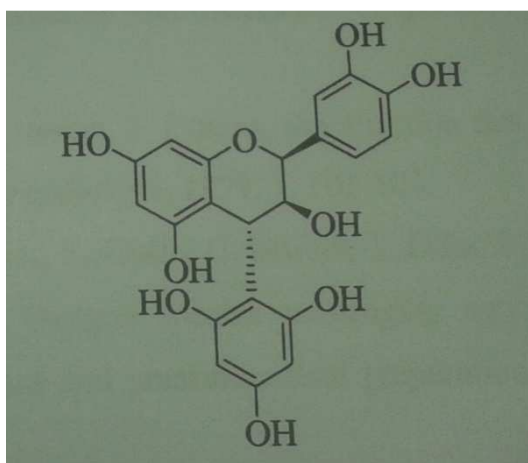


Figure 16 : Catéchine-(4 α →2)- phloroglucinole

4. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux

Parmi les principales vertus des plantes, on peut citer : stimulant de la digestion anti-inflammatoire, antalgique, antidiabétique, anti-cholestérol, tonique, antiparasitaire, antiseptique, antibactérien et anti fongique.

Les antimicrobienne phytochimique sont de plusieurs types. Le tableau ci-dessous résume les différentes catégories de ces composés.

Tableau 7 : Les principales classes des composés antimicrobiens des végétaux.

Classe	Sous Classe	Exemple
Polyphénols	Phénols simples	Catéchine Epicatéchine
	Acide phénoliques	Acide cinnamique
	Flavonoïdes et flavones	Chrysin Abyssinone
	Flavonoles	Totarol
	Tnins	Ellagitanins
	Coumarines	Warfarine
	Quinones	Hypéricine
Terpénoïdes et les huiles essentielles	//	Capsaïcine
Alcaloïdes	//	Pipérine Berbérine

4.1. Les composés phénoliques et polyphénols

Il a été récemment établi que les secoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés), une des classes principales des polyphénols contenus dans l'huile d'olive, empêche ou retarde la croissance d'une gamme de bactéries et de microchampignons. Malheureusement, la littérature ne mentionne aucune donnée au sujet de l'usage possible de ces secoiridoïdes en tant qu'agent antimicrobienne contre les bactéries pathogènes chez l'homme. Dans le cadre d'une étude menée par BISIGNANO et coll. ([Bisignano et al., 1999](#)), plusieurs souches bactériennes, des isolats cliniques et des agents causals des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme ont fait l'objet d'un examen *in vitro* à l'égard de la susceptibilité à deux secoiridoïdes de l'olivier (*Olea europaea*), l'oleuropéine (le principe amer des olives) et l'hydroxytyrosol (dérivé de l'oleuropéine par enzymatique et responsable de la stabilité élevée d'huile d'olive).

Cette étude indique que les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues représentent une preuve d'une large activité antimicrobienne de l'hydroxytyrosol contre les souches bactériennes et les souches isolées en clinique. En outre, l'oleuropéine a également inhibé la croissance de plusieurs souches bactériennes et des agents causals des infections chez l'homme.

Ces résultats montrent que, outre l'emploi potentiel de ses principes actifs comme additifs alimentaires ou dans des programmes de prise en charge, *olea europaea* peut être considéré comme une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme ([Bisignano et al., 1999](#)).

D'autres exemples sont mentionnés dans la littérature ([Wild., 1994](#) et [Dixon et al., 1983](#)). C'est le cas des phénols qui sont bactéricides *vis-à-vis* des bactéries Gram (+) et Gram (-), parfois des mycobactéries, et non aucune activité *vis-à-vis* des spores bactériennes. De plus, l'acide caféique isolé du thym est efficace contre les virus, les bactéries et les mycètes ([Wagenvoort et Kepers-Rietrae., 1997](#) et [Wild., 1994](#)).

Les flavonoïdes sont reconnus comme étant synthétisés par des plantes en réponse à l'infection microbienne ([Tsuchiya et al., 1996](#)). Ce qui s'avère des substances antimicrobiennes efficaces contre une grande sélection de micro-organismes.

Les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes (Borris., 1996). C'est le cas de la catéchine qui se trouve dans le thé vert et qui exerce une activité antimicrobienne contre Vibrio choléra (Aziz et al., 1998).

5. Caractéristiques des polyphénols de la caroube :

Peu d'études ont été consacrées à l'analyse des polyphénols de la caroube. Les teneurs et la composition en polyphénols diffèrent d'un auteur à un autre. Les fluctuations obtenues doivent être dues à différents facteurs comme la variété de la caroube, le pays producteur, la partie analysée (pulpe, fibre, partie soluble ou partie résiduelle insoluble), les méthodes utilisées pour l'extraction des polyphénols ou leur détermination (Marakis, 1996). Les variétés sauvages sont plus riches en tannins que les variétés cultivées (Marakis et al, 1993).

Une gousse de caroube contient, en moyenne, 19 mg de polyphénols totaux par g de matière fraîche, 2,75 mg/g de tannins condensés et 0,95 mg/g de tannins hydrolysables. A noter que des concentrations beaucoup plus élevées (40,8 mg/g de polyphénols totaux, 16,2 mg/g de tannins condensés et 2,98 mg/g de tannins hydrolysables) sont détectées dans le germe alors que ces composés se trouvent à l'état de traces dans la graine (Avallone et al, 1997).

La teneur en tannins condensés des gousses de caroube se situe entre 16 et 20% de la masse sèche (Würsch et al, 1984), (Saura-Calixto, 1988) rapporte aussi une teneur en polyphénols de 19,2% (17,9% de tannins condensés et 1,3% de tannins solubles dans l'eau). 94% de ces polyphénols font partie des résidus de fibre de la caroube.

Les polyphénols de la caroube ont une masse moléculaire très élevée rarement rencontrée chez d'autres plantes (Würsch et al, 1984). Près de 50% des tannins sont de masse moléculaire comprise entre 3200 et 3600 Dalton (Tamir et al, 1971), l'autre moitié se rencontre sous forme de granules de plus haute masse moléculaire avoisinant 32 000 Da (Würsch et al, 1984).

Les principaux polyphénols décrits dans les gousses de caroube sont insolubles, hautement polymérisés, appartenant aux tannins condensés contenant un noyau flavane (Würsch et al, 1984). Le degré de polymérisation des flavanols, estimé par (Kumazawa et al, 2002) est de 31,1% et les flavanols constituent 23% des polyphénols totaux.

6. Effets antibactériens et antifongiques des composés phénoliques

Le potentiel antimicrobien de le huit composant phénolique isolé à partir du tourteau des olives a été examiné à l'égard de la croissance de *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae*, *Bacillus creus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Les composants phénoliques incluait les acides *p*-hydroxy benzoïque, vanillique, caféique, protocatéchique, syringique, et *p*-coumarique, l'oleuropéine et la quercétine.

Les acides caféique et protocatéchique ont empêché la croissance de *E. coli* et *K. pneumonie*. Les mêmes composants indépendamment de l'acide syringique ont complètement inhibé la croissance de *B. cereus*. D'autre part, l'oleuropéine, et les acides *p*-hydroxy-benzoïque, vanillique et *p*-coumarique ont complètement inhibé la croissance de *E. coli*, de *K pneumoniae* et de *B. cereus*.

Les acides vanilliques et caféique ont inhibé la croissance et la production d'aflatoxine par *A. flavus* et *A. parasiticus*, tandis que l'inhibition complète a été atteinte avec les acides *p*-hydroxy-benzoïque, protocatéchique, syringique, et *p*-coumarique et de quercétine(Tranter *et al.*, 1993).

III. Les bactéries lactiques et les prébiotiques

1. Définition

Les prébiotiques sont des oligosaccharides définis comme « non digestible ingrédients alimentaires » qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités suffisantes, de manière sélective stimulent la croissance et /ou l'activité d'une ou d'un nombre limité des microbes dans le colon entraînant des avantages pour la santé. Ils ont une incidence positive sur la composition et le métabolisme de l'activité de la microflore intestinale.

Les composés prébiotiques peuvent aussi avoir immunomodulateur propriété, avec ou sans l'ajout de bactéries probiotiques. En outre, les effets des prébiotiques comme agents stabilisants dans des produits probiotiques pendant le stockage, la lyophilisation, et séchage par pulvérisation ont été rapportés par plusieurs auteurs.([Desmond et al 2005](#) ; [Schwab et al 2007](#)).

Autre autorisation d'oligosaccharide sont, par exemple, une faible valeur calorique, sucré réduit agissant comme des agents anti caries, possibilité de modifier la viscosité et le point de congélation d'aliments.

Selon ([robertfroid, 2007](#)),les critères de classement des prébiotiques sont les suivants :

- La résistance à l'acidité gastrique
- L'hydrolyse par le mammifère enzyme gastro-intestinal et l'absorption
- La fermentation par la microflore intestinale et la stimulation sélective de la croissance et /ou de l'activité de l'intestine bactérie associées à la santé et au bien-être.

Au contraire des probiotiques, la plupart des prébiotiques sont utilisés comme ingrédients alimentaires dans les biscuits, les céréales, le chocolat, la pâte à tartiner et autres produits alimentaires, par exemple. Les prébiotiques les plus communs sont :

- L'oligofructose
- L'inuline
- Les galacto-oligosaccharides
- Le lactulose
- Les oligosaccharides du lait maternel

Pour classer un ingrédient alimentaire comme prébiotique, il existe 5 critères qui doivent être validés (Wang, 2009):

Il doit être résistant aux différents processus de digestion pour atteindre le colon

- Il doit pouvoir être fermenté par la microflore intestinale
- Il doit être bénéfique pour la santé de l'hôte
- Il doit stimuler de façon sélective les probiotiques
- Il doit rester stable durant les différents traitements alimentaires du procès

Les molécules qui, à ce jour, satisfont à ces critères sont les inulines, les galacto oligosaccharides(GOS) et le lactulose. Elles entrent dans la composition de certains aliments et compléments alimentaires. Les inulines sont des mélanges d'oligo et de polysaccharides essentiellement composés de fructose. Les termes de fructo oligosaccharides (FOS) et d'oligo fructose sont utilisés pour des inulines de faible poids moléculaire.

D'autres candidats existent (isomalto-oligosaccharides, lacto sucrose, xylooligosaccharides, oligosaccharides du soja, gluco-oligosaccharides, gomme arabique, hydrolysats de pectines...) qui ont fait ou font l'objet d'études préliminaires mais sans, à ce jour, satisfaire les critères ci-dessus.

Parmi les prébiotiques commercialisés, on retrouve l'inuline, les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, les isomalto-oligosaccharides, les malto-oligosaccharides, les xylooligosaccharides. (Mussatto et al, 2007).

2. Les différentes familles prébiotiques

On peut classer les prébiotiques en deux grands groupes : les prébiotiques reconnus, dont certains sont commercialisés, et les prébiotiques émergents.

2.1. les prébiotiques reconnus

Le premier groupe est essentiellement constitué de trois familles : les fructo oligosaccharides (FOS), les galacto oligosaccharides (GOS) et le lactulose ; ces prébiotiques sont aujourd'hui bien reconnus au Japon, en Europe et aux Etats Unis.

2.2. Les FOS et l'inuline

Les FOS sont des oligomères de D-fructose associés par des liaisons α -(1→2) avec un résidu D-glucose en bout de chaîne lié en β -(1→2). Ils sont obtenus par réaction d'hydrolyse enzymatique de l'inuline. L'inuline est un ensemble de polymères de fructose de DP >20, elle est extraite industriellement de la chicorée, mais on la trouve également dans l'ail, l'oignon, la tomate, la banane et l'artichaut de Jérusalem. (Crittenden, 1999).

Ce sont les prébiotiques les plus étudiés et leur aptitude à stimuler la croissance de Bifidobactérium a été établie par de nombreuses études tant in vitro que in vivo. (Roberfroid, 1998).

2.3. Les Galacto oligosaccharides (GOS)

Ce sont des oligomères de la forme $\text{Glc } \alpha$ -(1→4)-[β -(1→6) Gal]_n avec n de 2 à 5. Ils sont naturellement présents dans le lait mais également obtenus par synthèse enzymatique à partir du lactose. (Crittenden, 1999; Kolida, 2000). Ils sont non digestibles. (Bouhnik, 1997). Comme avec les FOS, les tests *in vitro* mettent en évidence un effet bifidogène mais ils accroissent également la population des lactobacilles. (Tanaka, 1983). Sur des rats porteurs d'une microflore humaine, (Rowland et al, 1993) a montré que les transgalacto oligosaccharides augmentaient le nombre de bifidobactéries et de lactobacilles mais en outre diminuaient le nombre d'entérobactéries. De plus ces oligomères réduisent les activités enzymatiques néfastes. Chez l'homme plusieurs études aboutissent aux mêmes résultats. (Tanaka, 1983 ; Ito, 1990).

2.4. Le Lactulose

C'est un disaccharide synthétique galactose- fructose lié en β -(1→4) dérivé du lactose. Il est connu pour ses effets laxatifs lorsqu'il est pris à fortes doses (supérieures à 20g par jour). (Salminen, 1997). Mais à plus faibles doses, il agit en tant que prébiotique en augmentant le nombre de bifidobactéries alors que le nombre de *Clostridium perfringens*, de *Bacteroides*, de *streptocoques* et d'entérobactéries décroît. (Salminen, 1997; Terada, 1992; Ballongue, 1997; Tuohy, 2002).

2.5. Les prébiotiques émergents

Plusieurs causes sont à l'origine du développement de nouveaux prébiotiques : tout d'abord les progrès réalisés dans les processus de production (Gibson, 2000), puis les développements des biotechnologies et de la génétique moléculaire (Rabiu, 2001; Rastall, 2002), enfin la recherche de diversification des voies de valorisation de certains produits naturels, déchets de l'agriculture.

Parmi ces prébiotiques émergents on peut citer : les isomalto oligosaccharides (IMO), les oligosaccharides de soja (SOS) et les xylooligosaccharides (XOS).

On ajoutera, dans une moindre mesure en terme de travaux d'expertise, les gluco-oligosaccharides et les pectioligosaccharides (Rycroft, 2001; Olano-martin, 2002; Rastall, 2002). Il a également été avancé que les amidons résistants pouvaient entrer dans cette catégorie. (Crittenden, 2001; Wang, 2002; Shuusuke, 2003).

3. La différence entre les prébiotiques et les probiotiques

Les prébiotiques sont des glucides non digestibles qui servent de « nourriture » aux probiotiques. Les prébiotiques contribuent à la prolifération et au maintien des probiotiques dans l'appareil digestif. Les glucides non digestibles ne sont pas tous des prébiotiques. Tous les prébiotiques doivent respecter des critères scientifiques particuliers. Les probiotiques sont de bonnes bactéries naturellement présentes dans notre appareil digestif, plus particulièrement le côlon. Certains probiotiques ont été associés à des bienfaits spécifiques pour la santé. (Roberfroid, 2001).

4. Critères de sélection d'un prébiotique

Afin de satisfaire à la définition des prébiotiques, les molécules doivent pouvoir atteindre intactes le côlon où elles pourront alors être fermentées sélectivement dans l'écosystème intestinal complexe. Les candidats prébiotiques doivent être sélectionnés selon les différents critères décrits dans le Tableau 2.

Tableau 8 : Proposition de critères de sélection des prébiotiques à application intestinale.

([Franck, 2002](#) ; [AFSSA, 2003](#)).

CRITERES DE SECURITE	produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient parfaitement caractérisés procédé d'obtention parfaitement décrit identification et caractérisation des molécules actives identification des microorganismes ciblés pour la fermentation pas de production excessive de gaz
CRITERES FONCTIONNELS	non digestibilité et non assimilation dans la partie supérieure du système gastro-intestinal fermentescible dans le côlon de façon sélective par un nombre limité de bactéries potentiellement favorables capacité à altérer la composition de la microflore colique en faveur d'une flore potentiellement plus saine induction éventuelle d'effets systémiques qui peuvent être positifs pour la santé de l'hôte
CRITERES TECHNOLOGIQUES	pas de modification de l'ingrédient au cours des transformations et du stockage des préparations

Les doses recommandées pour que les prébiotiques soient efficaces, dépendent du profil bactérien des sujets et de la nature de ces molécules actives. En effet, certains prébiotiques de faible masse molaire sont susceptibles d'induire la production de plus forte quantité de gaz à l'origine de douleurs abdominales et pourraient provoquer à forte dose des diarrhées osmotiques. Par ailleurs, les prébiotiques sont faiblement tolérés par les personnes à troubles intestinaux. ([Cummings et MacFarlane, 2002](#) ; [Marteau et al, 2001](#)). En outre, jusqu'à présent, aucun élément n'indique un risque particulier allergique lié à l'utilisation de glucides indigestibles. ([AFSSA, 2003](#)).

5. Aspect réglementaire des prébiotiques

Les prébiotiques sont classés au niveau européen en tant qu'ingrédient alimentaire ou additif alimentaire. ([Franck, 2002](#)).

Tout comme pour les fibres alimentaires, la non-digestibilité des prébiotiques est une des caractéristiques principales. La question se pose donc de savoir s'il faut classer ou non les prébiotiques en tant que fibres alimentaires. Pour l'instant, seuls les FOS Actilight et

Raftilose ont obtenu les confirmations réglementaires du statut de fibres solubles depuis 2002.(**Champ, 2003**).

6. Mécanisme d'action des prébiotiques:

- Survivre à l'acidité de l'estomac
- Eviter leur digestion dans l'intestin grêle
- Favoriser la fermentation sélective par les bactéries saprophytes du colon
- Stimuler la croissance des probiotiques (bifidobactéries)
- Stimuler la motilité intestinale et la réabsorption d'eau, d'électrolytes et des sels minéraux (Ca^{++} , Mg^{++})

Figure 17 : les mécanismes d'action des prébiotiques(**Roberfroid, 2007**).



7. Effet bénéfique des prébiotiques sur la santé :

7.1. Santé du système digestif

On constate un intérêt grandissant pour les aliments qui contribuent à une saine digestion. Les prébiotiques sont des substances qui favorisent la régularité du système digestif en encourageant la prolifération des bactéries bénéfiques dans les intestins. Les recherches semblent indiquer qu'un avantage numérique de bonnes bactéries aide le système digestif à préserver sa santé normale, car cela signifie que les bactéries potentiellement nuisibles sont en position d'infériorité et qu'elles sont moins en mesure de causer des problèmes.

Plusieurs prébiotiques agissent sur le corps comme le feraient des fibres ; c'est-à-dire qu'ils ne sont pas complètement digérés lors de leur passage dans le système (GI) gastro intestinale ; et sont par conséquent considérés comme faisant partie des fibres alimentaires.

Une combinaison de prébiotiques tels que le polydextrose et le lactitol affecte l'écosystème microbien du tractus gastro-intestinal de rat et d'améliorer la réponse immunitaire en augmentant la sécrétion d'immunoglobulines A (IgA).(**Peuranen et al. 2004**).

En outre, dans le traitement de la trouble colite, il y a quelques indications expérimentales quant aux effets bénéfiques de l'inuline dans l'amélioration de la colite distale chez le rat.(Videla et al, 2001).

Chez les porcelets, (Tang et al, 2005) a rapporté que la supplémentation alimentaire de (OGM) par 0,12% galacto-oligosaccharide mannane a été en mesure d'augmenter les performances de croissance et de réduire la diarrhée.

7.2. Absorption minérale

Sans être laxatifs ni avoir directement l'effet fibre sur le volume, les prébiotiques améliorent le transit intestinal chez les gens souffrant de constipation ainsi que chez ceux souffrant de diarrhée.

Les prébiotiques ont également la capacité de réduire l'inflammation intestinale.

L'usage de prébiotiques augmente aussi l'absorption des minéraux. Cet effet est mesurable pour le magnésium, le calcium, le fer et le zinc. Lorsqu'elles utilisent les prébiotiques, les bactéries bénéfiques fabriquent des acides faibles (acides lactiques, butyrique) ; Ces acides abaissent le pH de l'intestin (le rendent plus acide), entraînant une amélioration du métabolisme de l'intestin en général et de l'absorption des minéraux, une réduction de la croissance des pathogènes etc.

Autre effet particulièrement intéressant, l'acide butyrique est utilisé par les cellules du gros intestin (le côlon) pour fabriquer de l'énergie et améliorer la santé de la paroi intestinale. Plus les bifidobactéries sont nombreuses et plus elles sont bien nourries (prébiotiques), plus elles produisent des acides gras à chaînes courtes (l'acide butyrique) qui améliorent l'environnement intestinal, aidant ainsi à prévenir la formation de cryptes aberrantes et de polypes et en bout de ligne, le cancer de l'intestin.

Chez les jeunes adolescents, la consommation quotidienne d'une combinaison de prébiotique à court et à longue chaîne, fructanes de type inuline de manière significative, augmente l'absorption du calcium et favorise la minéralisation osseuse pendant la croissance pubertaire. Effets des facteurs alimentaires sur le calcium l'absorption peut être modulée par des facteurs génétiques spécifiques, y compris vitamine D polymorphismes du gène du récepteur.(Abrams et al, 2005).

En outre, des études sur des modèles animaux ont montré une disponibilité d'augmentation du calcium avec de l'inuline et de l'oligofructose dans l'alimentation.(**Scholz-Ahrens et Schrezenmeir, 2007**).

D'un point de vue fonctionnel les prébiotiques agissent sur l'absorption du calcium et du magnésium ce qui améliorerait la minéralisation osseuse et diminuerait donc le risque d'ostéoporose.(**Scholz-ahrens, 2000**).

7.3. Prévention de cancer

La fermentation des prébiotiques conduit à la production d'acides gras à chaîne courte(AGCC) qui fournissent plusieurs effets sur la muqueuse colique.

En effet, ils affectent directement ou indirectement la prolifération des entérocytes de l'intestin, inflammation, la carcinogénèse, disponibilité des minéraux, et colonisation par des pathogènes, activités enzymatiques et la production de métabolites azotés. L'acide butyrique est utilisé par les cellules épithéliales de la muqueuse du côlon comme source d'énergie, étant en outre un facteur de croissance.(**Bugaut et Bentéjac, 1993**). De récentes études précliniques ont rapporté que le butyrate pourrait être dans la chimio-prévention de la carcinogénèse (**Scheppach et Weiler, 2004**) ou agent protecteur contre le cancer du côlon par la promotion de la différenciation des cellules.(**Kim, et al, 1982**).

En plus de butyrate, le propionate peut avoir des effets anti-inflammatoires sur les cellules du cancer du côlon. Dans une étude in vitro sur des lignées coliques HT29 L97 (qui représente le début et le stade final de cancer du côlon), les fractions de surnageant de la fermentation de inuline a montré une importante croissance d'inhibition et induction de l'effet apoptose dans les cellules tumorales du côlon humain. (**Munjal et al, 2009**).

8. Les prébiotiques dans l'alimentation des nourrissons

A côté de leurs effets sur la flore intestinale, les prébiotiques ont un effet sensible sur le comportement intestinal. Au niveau de l'intestin grêle, ils restent en solution dans le chyme et augmentent la pression osmotique, créent un appel d'eau dans la lumière intestinale. Au niveau du colon, la fermentation bactérienne s'accompagne de la production de gaz et d'acides gras à chaîne courte qui sont connus pour influencer la motilité intestinale.

Si ces effets sont recherchés chez l'adulte pour améliorer le transit intestinal et éviter les problèmes de constipation créés par notre alimentation moderne trop pauvre en fibres, il n'en est pas de même chez le nourrisson où une consommation élevée de prébiotiques peut créer des symptômes pathologiques : diarrhée, flatulence, coliques.

Des études cliniques sont en cours pour déterminer la dose à la fois efficace et bien tolérée chez le jeune enfant. Les premiers résultats obtenus avec les oligosaccharides à effet prébiotiques prouvés (oligofructose et inuline) se révèlent décevants : la dose de 2 g par jour est bien tolérée mais ne montre pas d'effet bifidogène, alors qu'au taux de 3 g par jour, on observe une augmentation significative du nombre de selles. (Guesry et al, 2000).

Les tannins de la caroube sont largement utilisés dans le combat des diarrhées chez l'enfant.(Loeb et al, 1989).

Tableau 9. Effets positifs des prébiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés).(Bornet et al., 2002 ; Franck, 2002 ; AFSSA, 2003).

EVIDENCES SCIENTIFIQUES FORTES	
EFFETS DES PREBIOTIQUES	MECANISMES DES PREBIOTIQUES
faible valeur calorique	non digestibilité et fermentation colique complète en lactate, acides gras à chaîne courte (acétate, propionate et butyrate) et gaz (CO ₂ , H ₂ , CH ₄)
modulation de la flore intestinale	fermentation sélective par la flore positive endogène au détriment de la flore pathogène
amélioration de la motilité intestinale et soulagement de la constipation	augmentation de la pression osmotique production de butyrate fournissant de l'énergie aux colonocytes production de gaz accroissement de la biomasse bactérienne
EVIDENCES SCIENTIFIQUES PROMETTEUSES	
EFFETS DES PREBIOTIQUES	MECANISMES DES PREBIOTIQUES
stimulation de l'absorption des minéraux et réduction des risques d'ostéoporose	acidification du milieu améliorant la solubilisation du calcium et du magnésium
effet hypolipidémique, effet hypoglycémique et prévention du diabète	production d'acétate et de propionate modulant la lipogénèse hépatique production de propionate modulant la gluconéogénèse hépatique libération d'hormones intestinales (incrétines)
diminution des diarrhées	fermentation sélective par la flore positive endogène au détriment de la flore pathogène production d'acides gras à chaîne courte stimulant l'absorption d'eau par le côlon
prévention des infections intestinales	fermentation sélective par la flore endogène positive production d'acides gras à chaîne courte induisant un environnement acide modulation du système immunitaire via la flore

9. la farine de la gousse de caroube FPC

La pulpe est très utilisée soit comme aliment diététique, soit comme remplaçant du chocolat, soit encore en alimentation animale. Elle est très riche en sucres (40-60%) en particulier, saccharose (27-40%), fructose (3-8%) et glucose (3-5%) mais pauvre en lipides (0,4-0,6%) ou protéines (2-6%). (Leroy., 1929;Avallone et al., 1997). Par ailleurs, la pulpe présente également une teneur très élevée en fibres (27-50%) et une quantité non négligeable de tanins.(Saura-calixto., 1988). Assez souvent, la pulpe est toastée et broyée donnant une poudre de couleur marron à arôme de chocolat (farine de caroube ; FPC). À part son utilisation en alimentation humaine, celle-ci semble particulièrement adaptée à l'alimentation du porc. Le remplacement du dextrose, de la poudre de lait ou des céréales par de la FPC permet d'obtenir des performances de croissance similaires chez le porcelet (Piva et al, 1978;Santiet al, 1987) aussi bien que chez le porc en croissance-finition (Lanza et al, 1983).Les sucres apportés par la FPC contribuent très probablement à la palatabilité des régimes et aucun effet antinutritionnel des tanins sur les paramètres mesurés n'est observé.

Les diarrhées de post-sevrage sont un problème très fréquent dans l'élevage du porc (Madec et al, 1998)et la décision de l'Union Européenne de prohiber l'utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs alimentaires n'a fait qu'aggraver la situation. Les tanins de la caroube présentent d'importantes propriétés anti-diarrhéiques (Würsch, 1987) et sont largement utilisés dans le combat des diarrhées chez l'enfant (Loeb et al, 1989).

10. Les bactéries lactiques

10.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli(Badis et al., 2005).Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont sporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*.(Salminen et al., 2004;König et Fröhlich., 2009 ; Pringsulaka

et al., 2011). En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 2004).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart., 2009).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments, tels les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux et les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme, sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (König et Fröhlich., 2009).

10.2. Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimiotaxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich., 2009).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk *et al.*, 1993). L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilliales et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de :

Aerococcus : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2 µm de diamètre), α-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

Carnobacterium : ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

Enterococcus : ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C.

Lactobacillus : les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes: homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

Lactococcus : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du

milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits.

Leuconostoc : ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6,5. Néanmoins, certains leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5.

La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires. **Oenococcus** : les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

Pediococcus : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi des tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C.

Streptococcus : les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH : 9,6.

Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

Vagococcus : les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

Tetragenococcus : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires.

Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

Weissella : les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique ([Salminen et al., 2004](#)).

10.3. Voies métaboliques des bactéries lactiques

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

- **Homofermentaires** : toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) empruntent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate.

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du

glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et al., 2010).

- **Hétérofermentaires** : ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentosesphosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol.

En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen et al., 2004).

10.4. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- **Dans l'industrie alimentaire** : les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart., 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele., 2001).

- **Dans le domaine thérapeutique** : étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire

(Yateem et al., 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et al., 2010).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El -Ghaish et al., 2011). (Uehara et al., 2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

10.5. Caractéristiques d'un probiotique

La définition du terme probiotique a grandement évolué au cours des dernières années. La plupart des articles scientifiques les décrivent comme un supplément nutritionnel composé de microorganismes vivants exerçant des effets bénéfiques pour le maintien de la santé. Cependant, certains auteurs spécialisés dans le domaine des probiotiques ont tenté d'établir un consensus sur des critères de sélection plus précis (Tuomola et al., 2001 ; FAO/WHO, 2001 ; FAO/WHO.,2002). Afin qu'un micro-organisme soit considéré comme probiotique, idéalement celui-ci doit remplir plusieurs conditions telles que :

Origine (**composantes d'un microbiote intestinal sain de préférence d'origine humaine**)

Biosécurité (**sans effets négatifs pour les humains, transfert génétique, résistance aux antibiotiques**)

Actif et viable (**activité dans des conditions intestinales ; survie aux conditions de fabrication et d'entreposage**)

Résistance à pH acide, aux sucs gastriques et pancréatiques ainsi qu'à la bile

Adhérence à l'épithélium et au mucus intestinal

Effet bénéfique pour l'hôte (**antagonisme microbien, modulation du système immunitaire, autre**)

Plusieurs espèces de bactéries ou levures sont considérées comme étant probiotiques. Malgré cette grande diversité, ce sont les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont

les plus étudiés. Ils font partie du groupe hétérogène des bactéries lactiques ([Prescott et al., 2003](#)). Ce sont des bactéries présentes naturellement dans plusieurs environnements, particulièrement dans les produits laitiers et les intestins animaux.

Les bifidobactéries sont d'ailleurs très présentes dans le colon chez l'humain, alors que les lactobacilles sont des bactéries en forme de bâtonnet, Gram+ et microaérophiles. Elles ont une température optimale de croissance entre 35 à 45°C. Elles sont souvent regroupées en chaîne, mais certaines souches peuvent aussi former d'importants agrégats, sans structure constante.

Les probiotiques peuvent produire de nombreuses substances antimicrobiennes (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines) qui ont la capacité de prévenir des infections intestinales ([Lee et al., 2003](#)). Le tableau suivant résume les principales espèces de micro-organismes utilisées comme probiotique.

Tableau10 : principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques ([Lee et al., 1999](#) et [Ouwehand et al., 2002](#))

Lactobacillus sp.	Bifidobacterium sp.	Autre
Lactobacillus acidophilus	Bifidobacterium adolescentis	Bacillus cereus
L. amylovorus	B. bifidum	Escherichia coli souche Nissle
L. casei	B. animalis	Enterococcus faecalis
L. crispatus	B. breve	Enterococcus faecium
L. delbrueckii subsp.	B. infantis	Lactococcus lactis
Bulgaricus	B. lactis	Leuconostoc mesenteroides
L. gallinarum	B. longum	Propionibacterium freudenreichii
L. gasseri		Pediococcus acidilactici
L. johnsonii		Streptococcus thermophilus
L. paracasei		Saccharomyces cerevisiae
L. plantarum		Saccharomyces boulardii
L. reuteri		Sporolactobacillus inulinus
L. rhamnosus		

1. L'objectif

Mettre en évidence l'activité antagoniste de polyphénol à différentes concentrations (5-10-25 et 50%) testée vis-à-vis deux bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* ATTC **29213** et un probiotique *Lactobacillus rhamnosus*.

2. Les souches pathogènes

Les différents souches pathogènes utilisées dans cet expérimental sont reportés dans le (Tableau 3).

Tableau 11 : Nature et l'origine de différentes souches pathogènes utilisées

Souches	Référence	Milieu de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213 ATTC	Bouillon BHI
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	VVB2	Bouillon MRS

3. Préparation de matériel végétal

Le matériel végétal constitué de gousses de caroube mure, a été collecté dans la région de REMCHI.



Figure 18: présentation du matériel biologique utilisé (gousse, grains, pulpe, farine)

➤ **Elimination des sucres**

La caroube étant riche en sucres simples, avant de procéder à l'extraction ; on laisse la farine de caroube, séchée et moulue préalablement, macérer pendant 12 heures dans de l'eau froide (3°C). Ce procédé, répété 2 fois, permet d'éliminer les oses présents (Kumazawa *et al.* 2002); on procède par la suite aux extractions sélectives.

4. Extraction des phénols totaux

10g du matériel végétal broyé est macéré dans 100ml de mélange méthanol/eau (70% v/v) pendant 20 minutes, à 40°C. Après filtration, le mélange méthanol/eau, est évaporé à sec sous pression réduite à 45°C. Le résidu obtenu est récupéré avec 12ml de méthanol pur, pour les dosages ultérieurs (Yu et Dahlgren, 2005).

5. Milieux de culture et conditions de croissance

Tous les milieux de culture préparés sont autoclavés à 121°C pendant 15 min. Les souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 et *Lactobacillus rhamnosus* ont été réactivées deux fois et cultivées respectivement sur BHI bouillon (**Brain-Heart-Infusion** : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) et MRS (milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al.*, 1960). L'incubation est faite en aérobiose pendant 24 h à 37°C. Pour l'étude de l'évolution du pathogène au cours de sa croissance le milieu Mueller-Hinton Gélose (Réf. CM0419 Oxoid, Biomérieux, France) à 37°C pendant 24 h en aérobiose a été utilisé ; les souches ont été cultivées au moins trois fois avant l'expérience.

6. Etude de l'évolution de la cinétique de croissance et de production

L'étude de l'évolution de la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* est effectuée dans le milieu MRS à pH 7,4 et le *Staphylococcus aureus* en milieu BHI à pH 7,4 à 37 °C en aérobiose. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement toute les 2 heures, pendant 24 heures afin d'évaluer la croissance (DO) à 600 nm par spectrophotométrie sur un spectrophotomètre de type Jenway 6700 Visible UV-Visible ; la détermination de l'évolution de la charge microbienne en micro cultures s'effectue par isolement sur milieu Mueller-Hinton gélose pour le pathogène et milieu MRS gélose pour le probiotique ; ces deux méthodes sont utilisées dans le but de déterminer la charge microbienne *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 et *Lactobacillus rhamnosus* évaluée à 10⁵ UFC/ ml mise en contact avec les différentes concentrations des extraits phénoliques.

7. Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)

Les boîtes de Pétri contenant 1000 µl de suspension bactérienne à 10⁵ UFC/ml sont remplies de 15 ml de Gélose molle Mueller-Hinton le contact du germe cible avec la gélose fait par homogénéisation pendant 3 mn. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 10 minutes à 37°C à l'étuve. À l'aide d'un emporte-pièce stérile, on pratique des cavités dans la gélose, ensuite chaque cavité est remplie par 50 µl de solutions de polyphénol à tester à différentes concentrations (5-10-25 et 50%). Les boîtes de Pétri avant de les incuber à 37°C pendant 24h sont placées à 4°C pendant 3 heures pour faciliter la diffusion des solutions de polyphénol. Les solutions de polyphénol diffusent radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne (EYMARD, 2003). L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Thompson *et al.*, 1996) cité par (Doumandjiet *al.*, 2010). La mesure de la zone d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante :

- Tous les essais sont réalisés en triple

$$Zi (mm) = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6mm)}$$

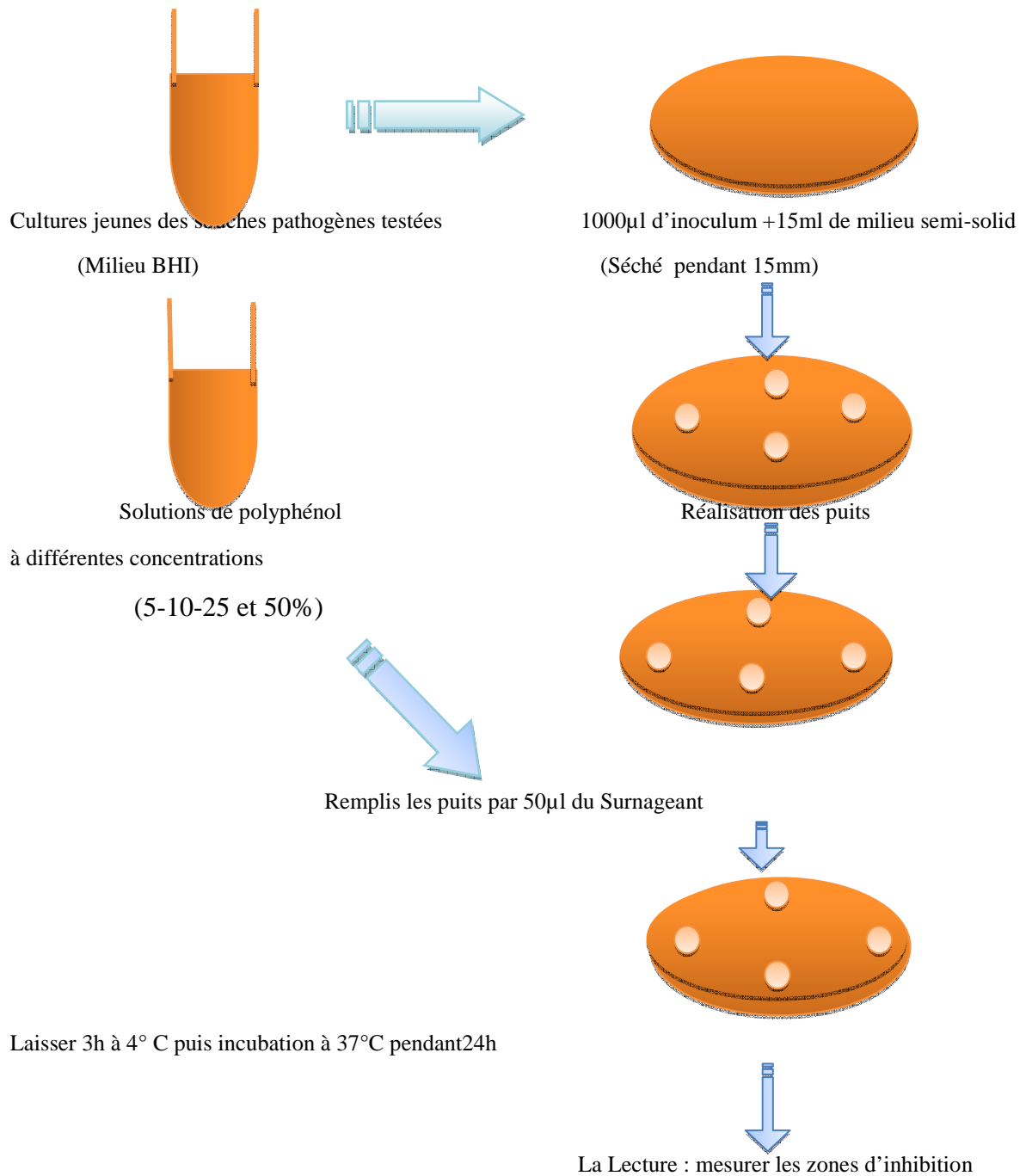


Figure 19 : Le schéma de test de l'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test).

8. Concentration minimale inhibitrice : test de micro-dilution

Les CMI sont aussi déterminées vis-à-vis des bactéries cibles. L'inoculum de chaque bactérie testée est obtenu à partir d'une préculture de 12 h d'incubation, la charge microbienne était ajustée à 5×10^7 ufc/ml à l'aide d'une turbidité standard 0,5 McFarland. Des dilutions en série sont préparées dans une gamme de concentration de (5-10-25 et 50%) dans des tubes à essai stériles contenant de bouillon MH. Les CMI des différents composés vis-à-vis des souches bactériennes sont déterminées par la méthode de micro-dilutions en puits.

Des plaques contenant 96 puits (Iwaki brand, Asahi Techno Glass, Japan) sont préparées en distribuant dans chaque puits 100 µl de bouillon MH et 100 µl d'inoculum. 100 µl de chaque solution des différentes concentrations des polyphénols préparés sont versés dans les premiers puits de chaque plaque. 100 µl de chaque dilution en séries sont transférés dans les puits successifs. Les derniers puits contenant uniquement 200 µl de bouillon MH et 100 µl d'inoculum étaient utilisés comme témoins négatifs. Le volume final de chaque puit était de 200 µl. Les plaques sont incubées sous agitation à 37°C/18–24h. Après incubation, tous les puits sont examinés et la CMI (% : v/v) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration en extrait qui inhibe tout développement bactérien (absence de turbidité). L'H₂O distillée stérile est utilisée comme témoin négatif. Chaque test est répété deux fois.

9. dosage de polyphénol par chromatographie couche mince

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange.

La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants.

On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile.

La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$\mathbf{Rf = hauteur\ de\ la\ tache / hauteur\ du\ front\ du\ solvant}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même Rf).

L'analyse sur couches minces est réalisée sur une plaque en verre de gel de silice (5×10 cm). Le système de solvant utilisé pour les polyphénols totaux est : chloroforme/méthanol (9/1).

L'échantillon des polyphénols totaux 15 mg est préparé dans 0.5 ml de chloroforme puis déposé en petit spot sur la plaque.

L'observation du chromatogramme est effectuée en lumière visible et sous U.V. à 366 nm.

1. La cinétique de croissance bactérienne

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les deux souches le pathogènes : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* ; présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, la cinétique de croissance est représentée respectivement dans la figure et avec des densités optiques variables selon l'espèce.

Il a été remarqué que pour les charges bactériennes de 10^5 UFC/ml ; le pathogène et le probiotique atteint 4h d'incubation la croissance est très rapide de 6h à 8h, les valeurs du taux e croissance diminue à partir de 8 heures.

2. Dénombrement des souches

La méthode de (Guiraud., 1998) utilisée, nous a permis d'ajuster la charge microbienne de nos souches, les résultats de dénombrement sont représentés respectivement, (10^7 et 10^8 UFC/ml) (Fig.20 et 21).

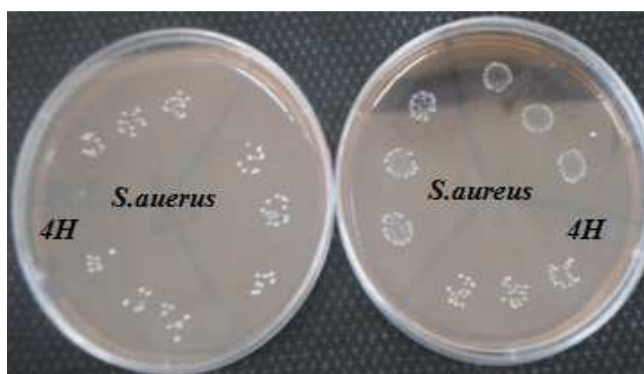


Figure 20 : Photo représentative de dénombrement de la solution mère de *staphylococcusaureus* ATCC 29213 à 4heures (original)



Figure 21 : Photo représentative de dénombrement de la solution mère de *lactobacillusrhamnosus* à 4 heures (original)

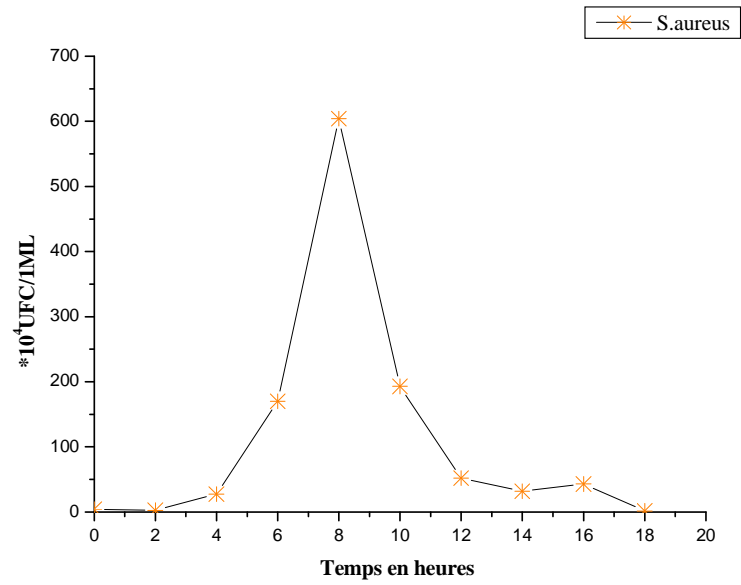


Figure 22 : Etude de la cinétique microbienne *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 durant 24 heures.

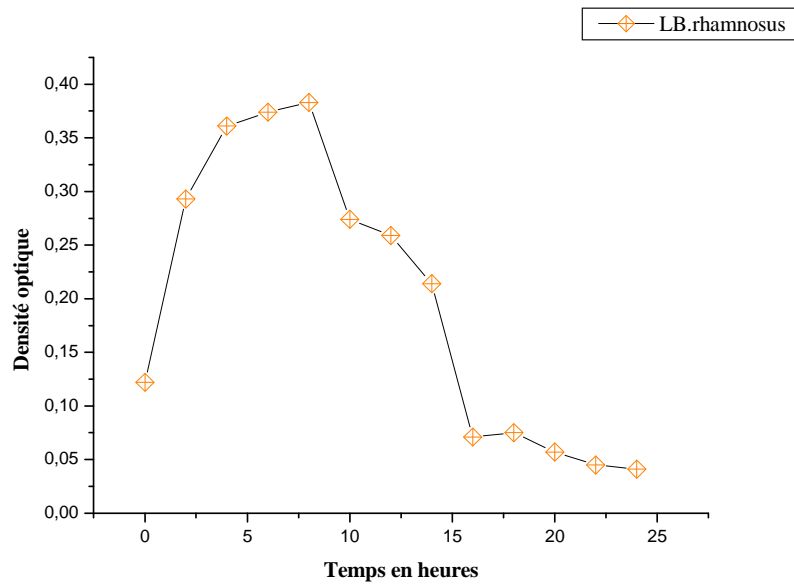


Figure 23 : Etude de la cinétique microbienne *Lactobacillus rhamnosus* durant 24 heures.

3. Démonstration du pouvoir antibactérien des polyphénols

3.1. Le pouvoir antibactérien des polyphénols-vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

La figure N°22 indique les résultats obtenus des tests de l'activité antibactérienne des polyphénols aux différentes concentrations (5-10-25-50%) sur la souche bactérienne suivante : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Le spectre d'activité antibactérienne apparaît comme des zones claires avec bordure distinctes comme l'indique la figure N°24, le diamètre d'inhibition est variable et varie de 10 à 18 millimètres (Fig. 22 et 24).

Pour *Staphylococcus aureus* la zone d'inhibition a été observée à des concentrations allant de 5 à 50 %. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 8 millimètres (Schillinger et Lucke., 2001).

Notre résultats montrent une activité antimicrobienne remarquable des extraits phénoliques vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, ces résultats concorde avec ceux de (AbdRazik et al., 2012) qui ont démontrés que les extraits phénoliques de la pulpe de la caroube ont une activité antimicrobienne contre divers agents pathogènes, y compris le *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition allant de 12 à 17 millimètres.



Figure 24 : photos représentatives d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par les différentes concentrations des polyphénols (original).

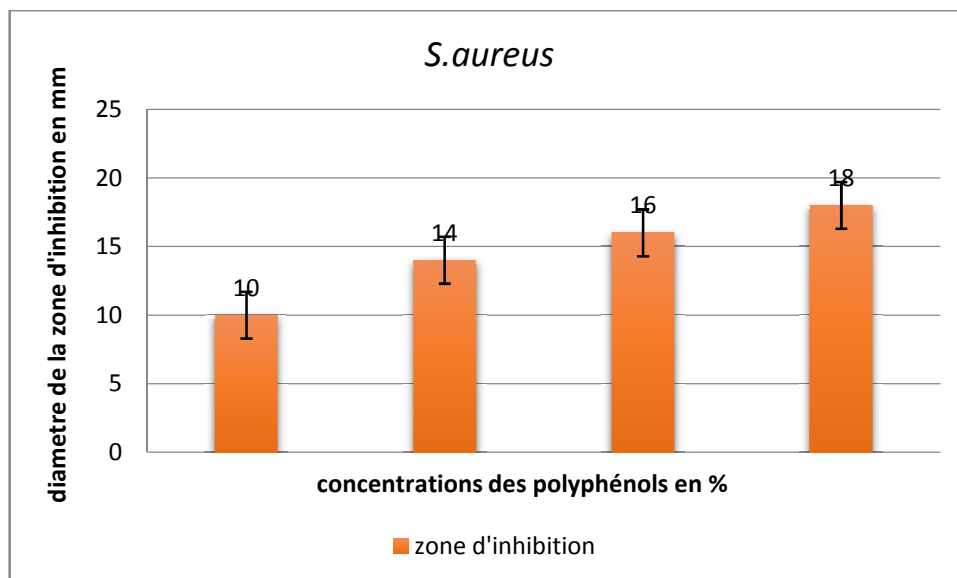


Figure 25 : diamètre des zones d’inhibition de *Staphylococcus aureus* en mm en fonction des concentrations des polyphénols.

La concentration la plus inhibitrice est de 50% avec un diamètre de la zone d’inhibition de 18 millimètres, les concentrations 10 et 25% ont un effet inhibiteur proche à celle de 50% respectivement 14 et 16 millimètres et la concentration 5% présente le plus faible effet inhibiteur avec un diamètre de la zone d’inhibition de $10 \pm 3,41$ millimètres.

Nous remarquons que les polyphénols ont une activité antimicrobienne très importante vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ceci s’explique par la présence de quantités considérables de composés phénoliques totaux et les flavonoïdes totaux dans l’extrait de méthanol de la gousse de *Ceratoniasiliqua* (Taleb-Contini et al., 2003).

Ces résultats se concordent avec ceux de (Chiang et al, 2002) qui ont démontrés que l’activité antimicrobienne de *Ceratonia .Siliqua* est due aux polysaccharides et principalement aux composés bioactifs des polyphénols. Cette activité est due précisément aux flavonoïdes qui se trouvent en quantité considérable dans les gousses de caroube.

Cette efficacité est due à la présence des flavonoïdes qui sont des métabolismes secondaires réputés pour leurs effets antibactériens (MounjdAbdRazik et al., 2012).

Nos résultats se rapprochent de ceux de (Ben hsouna et al., 2012) qui montrent une activité antimicrobienne et une efficacité d'inhibition de l'extrait méthanolique brut de gousses de *Ceratonia siliqua* (caroubier) testé sur 13 bactéries pathogènes isolées (8 Gram positives et 5 Gram négatives) le résultat d'inhibition sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 donnait un intervalle de zone d'inhibition allant de 20 à 25 millimètres.

3.2. Le pouvoir antibactérien des polyphénols vis-à-vis *Lactobacillus rhamnosus*

La figure ci-dessous montre le spectre d'inhibition des polyphénols vis-à-vis de la souche probiotique : *Lactobacillus rhamnosus* le meilleur diamètre d'inhibition est enregistré aux concentrations de 25 et 50%

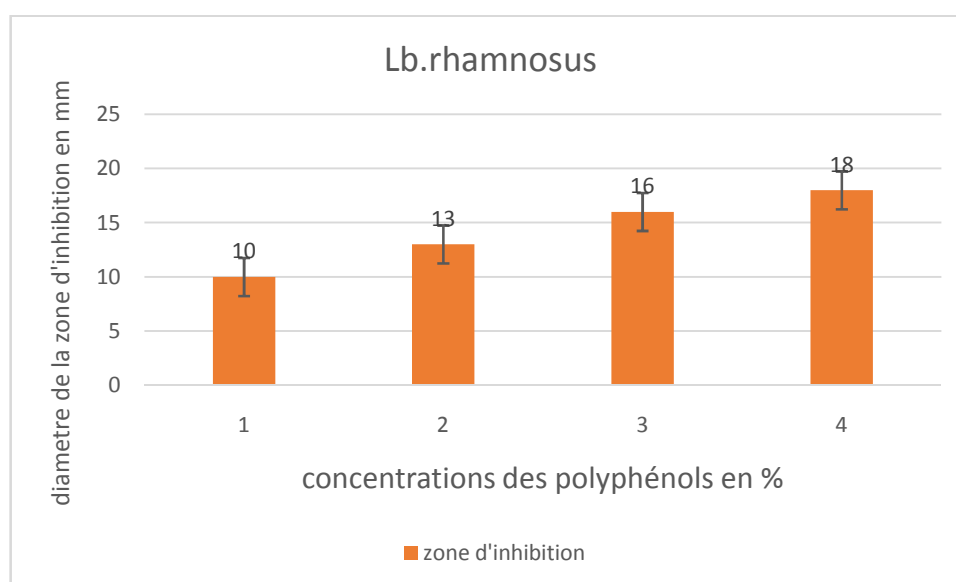


Figure 26 : diamètre des zones d'inhibitions de *Lb.rhamnosus* en mm en fonction des concentrations des polyphénols



Figure 27 : photos représentatives d'inhibition de *Lb. rhamnosus* par les différentes concentrations des polyphénols (original).

La concentration la plus inhibitrice est de 50% avec un diamètre de la zone d'inhibition de 18 millimètres, les concentrations 10 et 25% ont un effet inhibiteur proche à celle de 50% respectivement 13 et 16 millimètres et la concentration 5% présente le plus faible effet inhibiteur avec un diamètre de la zone d'inhibition de 10 millimètres.

Nos résultats concordent avec ceux de (Ben hsouna et al., 2012) qui ont démontrés que l'extrait phénolique de la pulpe de caroube a un effet bactéricide contre les bactéries lactique (*Lactobacillus subtilis* ATCC 6633 et *Lactobacillus cereus* ATCC 14579) avaient un intervalle de zone d'inhibition allant de 15 à 20 millimètres.

(Abdrazik et al., 2012) ont aussi démontrés que les polyphénols de la caroube ont un effet inhibiteur sur *Lactobacillus sp.* Avec un intervalle de la zone d'inhibition allant de 9 à 13 mm.

3.3. Le pouvoir antibactérienne des polyphénols vis-à-vis une culture mixte de *staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Lactobacillus rhamnosus*

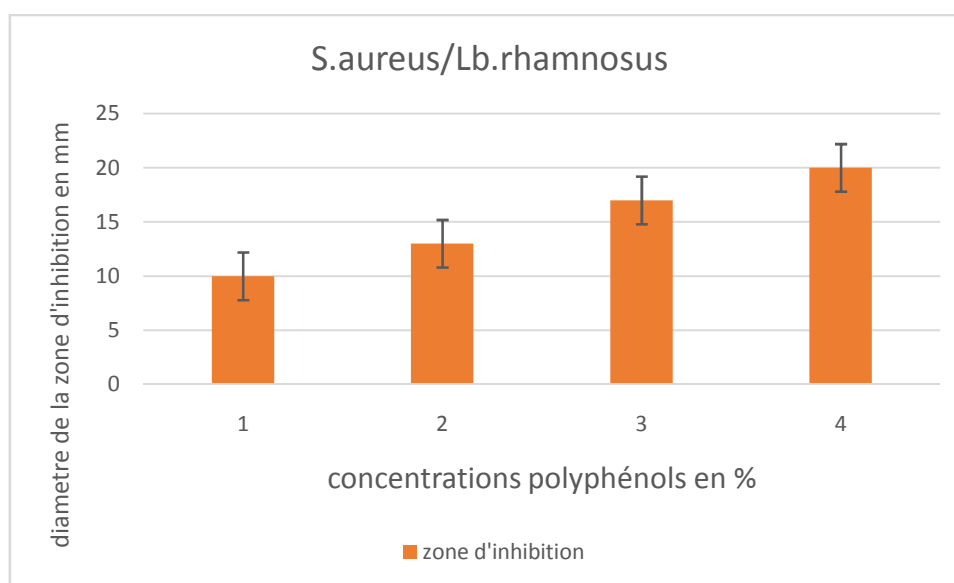


Figure 28 : diamètre des zones d'inhibitions de *S.aureus* et *Lb.rhamnosus* en mm en fonction des concentrations des polyphénols.



Figure 29 : photos représentatives d'inhibition d'une culture mixte de *S.aureus* et *Lb.rhamnosus* par les différentes concentrations des polyphénols (original).

Les résultats illustrés dans la figure ci-dessus montrent le pouvoir antagoniste des polyphénols contre le mix contenant les staphylococcus et les lactobacilles.

Le diamètre de la zone d'inhibition varie de 10 à $20 \pm 4,39$ mm, les concentrations les plus inhibitrices sont 25 et 50%.

Nous remarquons que le diamètre d'inhibition a augmenté pour les concentrations 25 et 50% de 17 à 20mm.

Les probiotiques ont un effet antibactérien (Adams., 1999), ce qui explique nos résultats.

Dans l'étude de (Kalui et al., 2009) sur les caractéristiques fonctionnelles de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* issu de maïs fermenté « ikii » ont démontré le pouvoir antibactérien de *Lb.rhamnosus* sur *S. aureus* NCTC 6571 avec une zone d'inhibition de 18mm.

La forte activité antimicrobienne de *ceratonia séliqua* contre une variété de microorganismes est due au pourcentage élevé de l'hydrocarbure (51,06%), monoterpène (0,9%) et le monoterpène oxygéné (1,19%) qui sont appréciés pour le potentiel antimicrobien (Bijen et al., 2002).

4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

D'après les résultats obtenus précédemment nous nous sommes intéressés à déterminer la concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques de *ceratonia séliqua* sur les deux souches bactériennes, le pathogène : *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 et le probiotique : *lactobacillus rhamnosus* sur microplaques en milieu liquide. (Tableau 12).

Tableau 12 : résultats de la CMI des extraits phénoliques vis-à-vis les deux souches bactériennes.

Souches bactériennes	CMI %
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 29213	3,12%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,56%
<i>S.aureus/Lb.rhamnosus</i>	1,56%

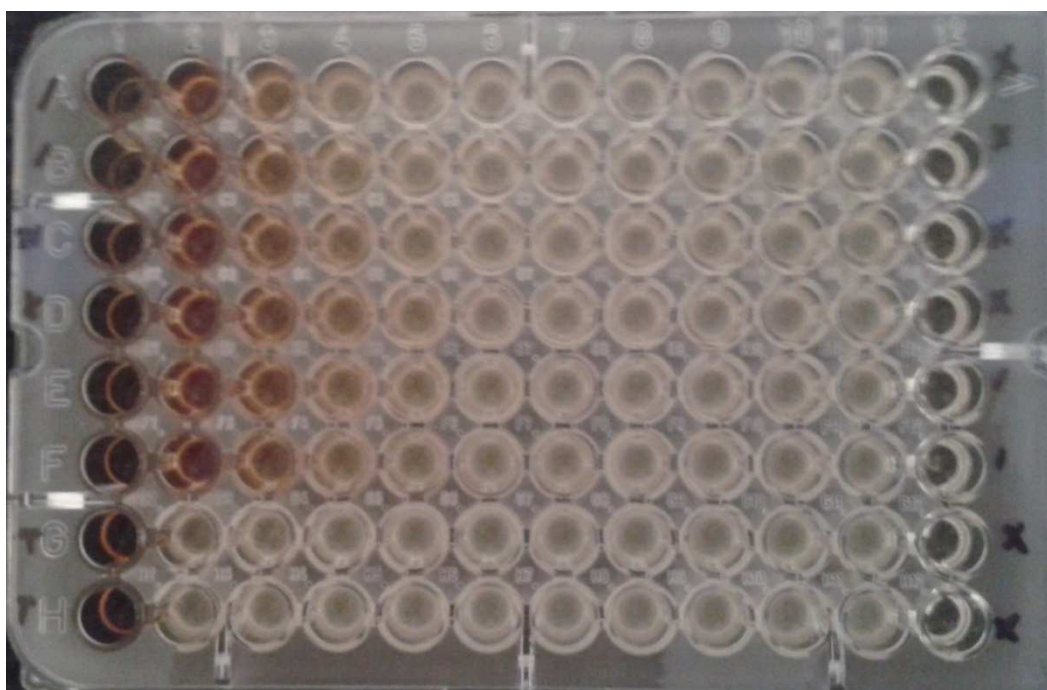


Figure 30 : la concentration minimale inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 et *Lactobacillus rhamnosus* pour une durée d'incubation de 24h à 37°C (original).

La concentration minimale inhibitrice varie de 1,56% à 3,56% dépendamment de la bactérie cible.

Les résultats obtenus montrent que l'effet inhibiteur des extraits phénoliques est important chez le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* et la culture mixte (*S.aureus/Lb.rhamnosus*) par rapport à la souche pathogène *Staphylococcus aureus* ATTC 29213.

Ces résultats s'expliquent par la nature de la bactérie cible qui joue un rôle important dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice, en général, les bactéries Gram-positives sont plus sensibles aux propriétés antimicrobiennes que celles à Gram négatif (Bagamboula et al., 2004). ces différences pourraient être attribués en grandepartie à la complexité de la double membrane contenant l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram négatif par rapport à la structure de la membrane unique des bactéries Gram positifs, ou lié à la présence des lipopolysaccharides dans la membrane externe (Gao et al., 1999).

Les résultats obtenues par (Ben hsouna et al., 2009)montrent un l'effet inhibiteur des extraits phénoliques plus important que le nôtre : 0,031% pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6536 ; et 0,062% pour *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus cereus* ATCC 14579.

5. Dosage des polyphénols par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couches minces (CCM) est une méthode d'analyse couramment utilisée pour l'identification de composés organiques, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté des produits analysés (Autran., 1991). De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange.

Pour une caractérisation partielle des extraits de *CeratoniaSeliqua*, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée. Les standards utilisés sont des composés phénoliques ; la quercétine, catéchine sont des flavonoïdes ; l'acides tannique et l'acide gallique sont des acides phénoliques.

Le système de migration utilisé chloroforme/méthanol (9/1).

Les résultats de la chromatographie des extraits phénoliques sont illustrés dans la figure ci-dessous.

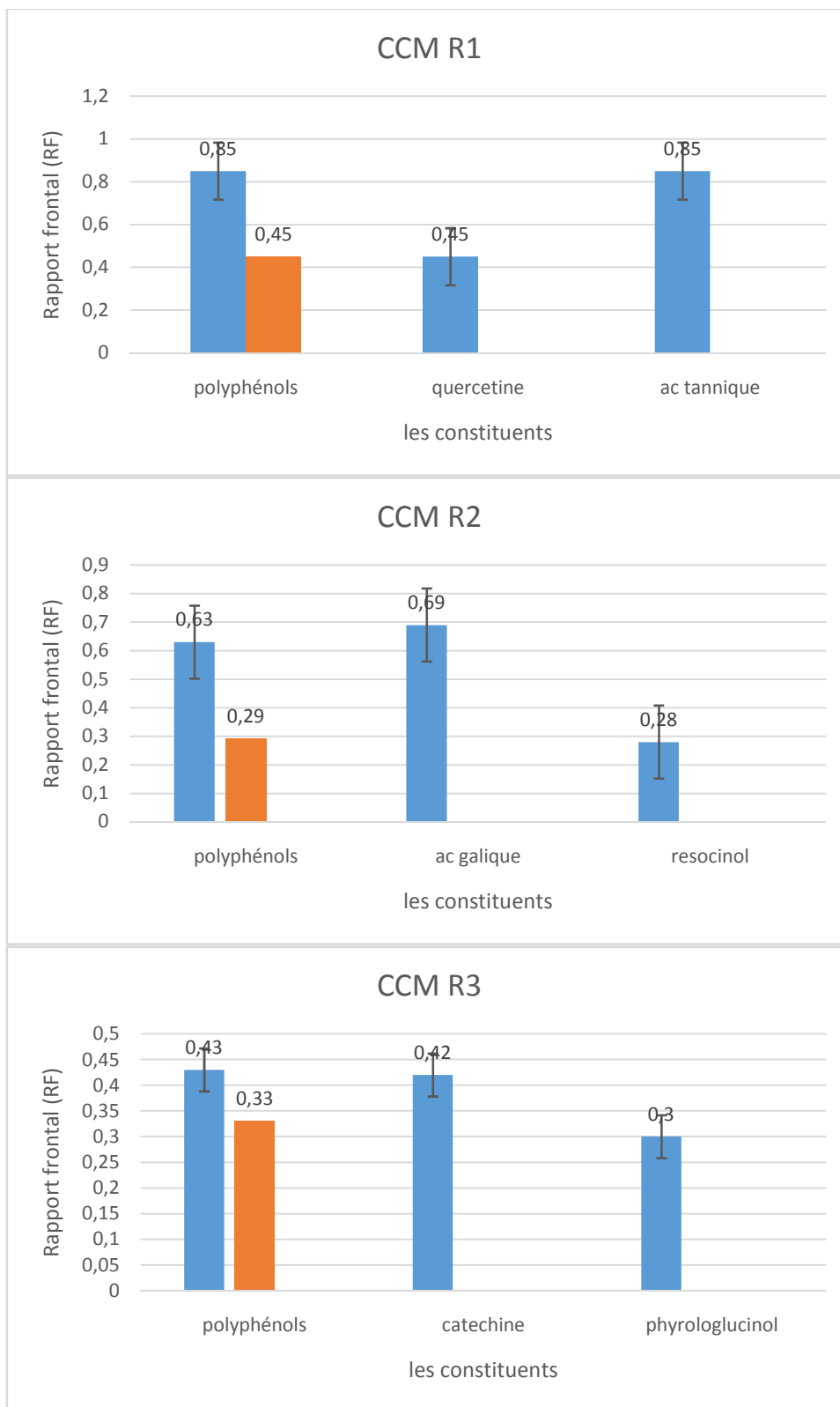


Figure 31 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques de la farine de pulpe de caroube.

Tableau 13 : rapports frontaux en fonction des standards

Standards	RF	Classe phénolique
Polyphénols	0,85 0,45 0,63 0,29 0,43 0,33	
Quercétine	0,45	Flavonol
Acide tannique	0,85	Acide phénolique
Acide gallique	0,69	Acide phénolique
résorcinol	0,28	Phénols simple
Catéchine	0,42	Flavonol
Phloroglucinol	0,3	

Le système de solvant chloroforme/méthanol nous a permis de mettre en évidence six composés (Tableau 11).

Les résultats de l'étude de [\(Rakib et al., 2010\)](#) ont montré que dans tous les échantillons analysés, les polyphénols les plus abondants sont l'acide gallique, le gallate glucoside et glucoside acide gallique.

L'analyse des extraits des pulpes et des graines du caroubier des deux localités montre leur richesse en composés phénoliques, L'acide coumarique et l'acide gallique sont les acides phénoliques majoritaires identifiés aussi bien dans les extraits des pulpes que dans ceux des graines. [\(Fadel et al., 2011\)](#).

Conclusion

Il est connu depuis les époques antiques que quelques plantes et épices ont une activité antimicrobienne. Il y a eu un intérêt considérable de les utiliser pour éliminer les microorganismes qui ont développé une certaine résistance aux antibiotiques.

Dans le présent travail, nous avons tenté de contribuer à la valorisation de la pulpe de caroube en Algérie en exploitant ses activités biologiques.

La pulpe de caroube est utilisée comme agent conservateur, exhausteur de goût, agent gélifiant, substituant de cacao, additif dans l'alimentation de bétail et comme traitement de diarrhées chez les nourrissons.

Le présent travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne contre des souches bactériennes (pathogène et probiotique).

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé l'efficacité de tous les extraits contre les souches testées respectivement *S.aureus*, *Lb.rhamnosu* et la culture mixte (*S.aureus/Lb.rhamnosu*). Aussi, les résultats ont démontré des zones d'inhibition de 10 mm à 14 mm pour des extraits de 5% à 10% et de 16 mm à 18 mm pour des concentrations allant de 25% à 50% ; 10mm à 13mm pour les extraits de 5 à 10%, et de 16mm à 18mm pour des concentrations allant de 25 à 50% respectivement; le diamètre d'inhibition de la culture mixte (*S.aureus/ Lb.rhamnosu*) s'est varié entre 10mm à 13 pour des extraits de 5 à 10% et de 17 à 20 mm pour les concentrations 25 à 50%.

Le dosage des polyphénols par chromatographie sur couche mince a révélé que notre polyphénol est riche en flavonol, acide phénolique et phénols simple.

Cette étude contribue à la connaissance de l'activité antimicrobienne de la pulpe de caroube *in vitro*, il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant et antimicrobien *in vivo*. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier les constituants bioactives de la pulpe de caroube.

Il serait aussi intéressant de tester les différentes molécules isolées (extraits de polyphénols et flavonoïdes) *in vivo* sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIUE

A

Aafi A., 1996. Note technique sur le caroubier (*Ceratoniasiliqua L.*). Centre Nationale de la recherche Forestière. Rabat (Maroc). 10p.

Albanell E., Caja G. et Plaixats J., (1991),Characterization of Spanishcarobpod and nutritive value of carobkibbles, Options Méditerranéennes N°16, pp. 135- 136

Avallone R., Plessi M., Baraldi M. etMonzani A., (1997), Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratoniasiliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins, Journal of food composition and analysis, Vol.10, pp.166–172

Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., (2007), Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°153, IAV Rabat, pp.1-4.

AFSSA., (2003), Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail. <http://www.afssa.fr>.

Abram S.A., Griffin I.J. et Hawthorne K.M. (2007), Effect of prebiotic supplementation and Ca intake on BMI, J. pediatr. 151, 293-298

Anis Ben, H., Mohamed, T., Riadh Ben, M., Raoudha,M.J., Mohamed, D., et Samir J : Chemical composition, Cytotoxicityeffect and antimicrobialactivity pf *Ceratoniasiliqua* essential oilwithpreservativeeffectsagainst *Listeria* inoculated in mineedbeefmeat. International journal of Food Microbiology, 2011 ; 148 :66-72.

B

Battle I. et Tous J., 1997.Carob tree. *Ceratoniasiliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops». 17.Institutue of plant Genetic and crops Plant Research. Gatersleben/International Plant RessourcesInstitutue. Rome. Italy. 97 p.

Bolonos M., 1955. Rapport sur le caroubier. Institutoforestal de Investigaciones y experiencias Madrid (Espagne) 9p.

Boudy P., 1950. Economie forestière Nord-Africain (tome II) : Monographie et traitement des essences forestière. Ed. Larose, Paris, pp.443-445.

Berrougui H., (2007), Le caroubier (*Ceratoniasiliqua L.*), une richesse nationale aux vertus médicinales, Maghreb Canada Express Vol. 5, N° 9.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37

Bouzouita N., A. Khaldi, S. Zgoulli, L. Chebil, R. Chekki, M.M. Chaabouni et P. Thonart., (2007), The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia *Food Chemistry* Vol. 101, N°4, pp. 1508-1515

Bengoechea B, A. Rome ro, A. Villanueva, G. Moreno, M. Alaiz, F. Millán, A. Guerrero et M.C. Puppo., (2008), Composition and structure of carob (*Ceratoniasiliqua L*) germ proteins *Food Chemistry*, Vol. 107, N°2, pp. 675-683

Batista M. T., Amaral M. T. etProença Da Cunha A., (1996), Carob fruits as source of natural antioxidant. In *Proceeding of the III International Carob Symposium*. Cabanas-Tavira, Portugal

Boudy P., (1950), Economie forestière Nord-Africain, Tome II : Monographie et traitement des essences forestières, Ed. Larose, Paris, pp.443-445.

Biner B, Gubbuk H., Karhan M., Aksu M. etPekmezci M., (2007), Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratoniasiliqua L.*) in Turkey, *Food Chemistry* N°100, pp.1453-1455

Bonnier G. (1990), la grande flore en couleurs (tome 3), pp.309-310

Ben Hsouna A., M. Trigui, S. Jaoua., (1986), Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of the ethyl acetate extract of endemic *Ceratoniasiliqua* leaves *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 34, N° 5, pp. 827-829

Baytop T., (1984), Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present), Publication of the Istanbul University, N°: 3255, Istanbul

Bouhnik Y., Flourie B. etD'Agay-Abensour L., (1997), Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* 1997;127:444–8.

Bugaut, M. et Bentéjac M., (1993), Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. Annual Review of Nutrition, 13, 217-241.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». Sci. Technol., 23: 30-37

Bijen, K et Tuba, M.,: Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Ceratonia siliqua L, Extracts. Turk J. boyl., 2002;26:197-200.

BEN HSOUNA Anis 1,2, Abdullah Sulaiman ALAYED2, and Emad M. ABDALLAH2*: Evaluation of antimicrobial activities of crude methanolic extract of pods of Ceratonia siliqua L. against some pathogens and spoilage bacteria; African Journal of Microbiology Research Vol. 6(14), pp. 3480-3484, 16 April, 2012 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJMR>

C

Calixto F.S. et J. Canellas., (1982), Components of nutritional interest in carob pods Ceratonia siliqua, Journal of the Science of Food Agriculture N°33, pp. 1319- 1323

Charalambous J. and Papaconstantinou J., (1966). Current result on the chemical composition of the carob bean. In the composition uses of carob bean (J. Charalambous, ed.). Cyprus Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture and Natural Resources Nicosia, Cyprus.

Coit J. E., (1962), Carob culture in the semi-arid southwest. Vista, CA: J. Eliot Coit. 6p

Crittenden R.G., (1999), Prebiotics. Dans: Tannock G. (Ed); Probiotics: a critical review. Horizon Scientific Press, Wymondham.

Crittenden R.G., Laitila A., Forssell P., Matto J., Saarela M. et Mattila-sandholm T., (2001), Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. Appl Environ Microbiol., Vol. 67, pp. 3469-3475.

Champ M., (2003), Les fibres alimentaires : définitions et aspects analytiques. La lettre scientifique de l'Institut Français pour la nutrition 91:1-11.

Cummings J. et MacFarlane G., (2002), Gastrointestinal effects of prebiotics. British Journal of Nutrition 87(suppl2):145-151.

Curk, M.C., Peladan, F., Hubert, J.C. (1993). Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*, 73: 215-231

D

Desmond C., Corcoran B.M., Coakley M., Fitzgerald G.F., Ross R.P. et Stanton C., (2005), Development of dairy-based functional foods containing probiotics and prebiotics. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 121–126.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143-154.

Dellaglio, F., DeRoissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., Loriga Uriage, France

E

El Allagui N., (2007), Action de différents extraits végétaux sur la mortalité des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sp., *Rev. Tela Botanica Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France BDNFF*, Vol. 4. N°4

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.*, 22: 509-516.

Eymard, L., Weill, A., Bourras, D., Guérin, C., Le Borgne, P. and Lefèvre, J.M. (2003). Use of shipmean data for validating model and satellite flux fields during the FETCH experiment. *Journal of Geophysical Research* 108. doi: 10.1029/2001JC001207. issn: 0148-0227.

F

Fournier P., (1977), Les quatre flores de la France (générale, alpine, méditerranéenne, littorale) Le Chevalier, Paris

Frank A., (2002), Prébiotiques. In *Aliments fonctionnels*, Roberfroid M (coordonnateur) Editions Tec & Doc, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Lavoisier, Paris, 105-123.

G

Garnit N., 2003. Caractérisation et essai de régénération in vivo du caroubier (*Ceratoniasiliqua* L.) originaire de la province de Chefchaouen (Nord-Ouest du Maroc).Th. Doc en science. Université Abdelmalek Essaadi. Tanger.

García-Ochao F. et Casas J. A., (1992). Viscosity of locust bean (*Ceratoniasiliqua*) gum solutions. J. Sci. Food Agri. 59: 97- 100

Gibson G.R., Berry-ottaway P. et Rastallr.A., (2000), Dans: Prebiotics: new developments in functional foods. Chandos Publishing Limited. Oxford.

Guesry P.R., (2005), Impact of 'functional food'. Forum Nutr (57): 73-83.

H

Hillcoat D., Lewis G. and Verdcourt B., 1980. A new species of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) from Arabia and the Somali Republic. Kew bull. 35(2):261-271.

Hariri A, N.Ouis, Sahnouni F et D.Bouhadi., (2009), mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, rev. microbiol. ind. san et environn. pp. 37-55.

I

Ito M., Deguchi Y. et Miyamori A., (1990), Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weight and abdominal sensation. MicrobEcol Health Dis 1990;3:285–92.J

K

Konate I., 2007. Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratoniasiliqua* L.) et des Bactéries endophytes qui lui sont associées. Université Mohammed V-Agdal Faculté des sciences Rabat, thèse de doctorat.

Kivçak B. et Mert T., (2002), Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratoniasiliqua* L. extracts. Turk J.Biol. N°26, pp.197-200

Kolida S., Tuohy K. et Gibson G.R., (2000), The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. Br Nut Bull., Vol 25, pp. 223 - 231.

Kim Y. S., Tsa O. D., Morita A., et Bella A., (1982), Effect of sodium butyrate and three human colorectal adenocarcinoma cell lines in culture. Falk Symposium, 31, 317e323.

König, H. et Fröhlich, J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. SpringerVerlag, Berlin Heidelberg

Kumazawa S., M. Taniguchi, Y. Suzuki, M. Shimura, Mi- Sun Kwon, and T. Nakayama., (2002), Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. J. Agric. Food Chem., Vol.50. N°2, pp. 373-377

Christine M. Kalui, Julius M. Mathara, Philip M. Kutima*, C. Kiiyukia and Lawrence E. Wongo: Functional characteristics of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosusfromikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge; African Journal of Biotechnology Vol. 8 (18), pp. 4363-4373, 15 September, 2009 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>

L

Lavalée P., 1962. Le caroubier, son utilisation dans l'alimentation du bétail en Algérie et en Tunisie ». Alger, 47p.

Leroy A. (1929), Elevage rationnel des animaux domestiques. Hachette ed, 448p

Lizardo R., Cañellas J., Mas F., Torrallardona D., et Brufau J., (2002), L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets, Journées de la Recherche Porcine, N°34,pp.97-101

Loeb H., Vandenplas Y., Wursch P. et Guesry P., (1989). J. Pediatric Gastroenterol. Nutr., 8, 480-485.

Lanza A., D'urso G., Lanza E., Aleo C., (1983), Técnica Agrícola, 35, 115-127.

Landolfi. R, et Cool., (1984), Biochempharmacol, 33,1525-1530

Lee, M. G., Yuk, I.-S., & Park, H. S. 2003b, in preparation [First citation in article](#)

M

Makris D. P. et P. Kefalas., (2004), Carob Pod as a source of polyphenolic Antioxidants, Food Technol. Biotechnol. vol. 42, N° 2, pp. 105–108

MAPA., (1994), Ministerio de Agricultura, Pesca Y Alimentación. Anuario de Estadística Agraria. Ed. Secretaría General Técnica, Madrid, Spain

Mussato SI. et Mancilla IM., (2007), Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydrate Polimers. 2007; 68:587-597.

Marteau P., DeVrese M., Cellier C. et Schrezenmeir J., (2001), Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American Journal of Clinical Nutrition 73(2Suppl):430S-436S.

Munjal, U., Gleis, M., Pool-Zobel, B. L., et Scharlau D. (2009), Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *British Journal of Nutrition*, 27, 1e9. Murphy Cowan M., (1999), Plant products as Antimicrobial Agents.

Madec F., Bridoux N., Bounaix S., Jestin A., (1998), *Preventive Vet. Med.*, 35, 53-72.

Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Blackwell publishing, Singapore.

Marth, E. H. et Steele, J. L. (2001). *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.

Mkrтчyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.

N

Neukom H., (1988), Carob bean gum: properties and application. Pp. 551- 555 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain

NAS., (1979), *Tropical legumes: resources for the future*, pp. 109- 116. National Academy of Sciences, Washington DC. USA.

Noblet J., Fortune H., Dubois S. et Henry Y., (1989), Nouvelles méthodes d'estimation de teneur en énergie digestible, métabolisable et nette des aliments pour le porc. INRA ed., Paris. 106p.

O

Ortiz P. L., Arista M. et Talavera S., (1996), Produccion de nectary frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *Anales del Jardin Botanico de Madrid* N°54, pp.540-546.

Orphanos P. I. and Papaconstantinou J., (1969), The carob varieties of Cyprus, *Tech. Bull.* 5. Cyprus Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resource, Nicosia

Olano-martin E., Gibson G.R. et Rastall R.A., (2002), Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol.*, Vol. 93, pp. 505-511.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Ant Van Leeuw* 82:279–289. doi:10.1023/A:1020620607611 [[PubMed](#)]

P

Passos de Carvalho J., (1988), Carob pollination aspects, in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain, pp. 281-291

Puhan Z. et Wielinga M. W., (1996), Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). Report Technical Committee of INEC (unpublished).

Priolo A., Waghorn G. C., Lanza M., Biondi L. et Pennisi P., (2000), Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* N°78, pp. 810- 816.

Peuranen, S., Tiihonen, K., Apajalahti, J., Kettunen, A., Saarinen, M., & Rautonen, N., (2004), Combination of microbial ecosystem and immune responses in rat gastrointestinal tract. *British Journal of Nutrition*, 91, 905 e 914.

PIVA G., SANTI E., AMERIO M., (1978), *Riv. Suinicoltura*, 19, 43-46.

Pringsulaka , O., Thonggam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547-551

Q

Que zel P. et S. Santa (1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome 1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.

R

Rejeb M. N., (1995), Le caroubier en Tunisie : Situations et perspectives d'amélioration, in *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.

Retana J., Ramoneda J. et Garcia del Pino F., (1990), Importancia de los insectos en la polinización del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*, N°16, pp.143-150.

Retana J., Ramoneda J., GarcíadelPino F., Bosch J., (1994), Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae), *J. Hort. Sci.*, Vol.69. N°1, pp.97-103.

Rejeb M. N., (1995), Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.

Rebour H., (1968), fruits Méditerranéen, la maison rustique Paris, 330pp.

Rejeb M. N., Laffray D. and Louguet P., 1991. Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) en Tunisie. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France. P:417-426.

Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A., and Gibson, G. R. (1998), The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 128, 11-19.

Roberfroid M., (2001), Prebiotic: the concept revisited. *J Nutr* 2007;137 (suppl): 830S–7S.

Rycroft CE., Jones MR., Gibson GR., Rastall RA, A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol*; 91:878–87.

Rabiu BA., Jay AJ., Gibson GR., Rastall RA., (2001), Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*;67:2526–30.

Rastall R.A., V. Maitin.,(2002), Prebiotics and synbiotics: Towards the next generation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 490–496.

Roberfroid M., (2001), Prebiotics: preferential substrates for specific germs ? *American Journal of Clinical Nutrition* 73(suppl):406S-409S.

S

Schroeder C.A., (1959), the floral situation of the Carob in California, *Proc. Am.*

Sbay H. et M. Abourouh., (2006), Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable : cas du pin pignon et du caroubier, Centre de Recherche Forestière Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification, Rabat, pp.1-9

Serairi-Be ji R., L. Mekki-Zouiten, L. Tekaya-Manoubi, M.H. Loueslati, F. Gue mira, A. Ben Mansour., 2000. Peut-on associer la pulpe de caroube et la solution de réhydratation orale dans le traitement de la diarrhée aiguë. *Med. Trop.*N°60, pp.125-128.

Sanchez M., Review C., (2002), Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems, *Food Sci. Tech. Int.* Vol.8, N°3, pp. 121 – 137 *Soc. hort. Sci.* N°74, pp. 248-251

Salminen S., et Salminen E., (1997), Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scan J Gastroenterol .*, Vol 32, pp. S 45 – S 48.

Scholz-ahrens K. et Schrezenmeir J., (2000), Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Brit. J.Nutr.*, Vol. 87, pp. S 186 – S 219.

Scholz-Ahrens, K. E., & Schrezenmeir, J., (2007), Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *Journal of Nutrition*, 137(11 Suppl.), 2513S-2523S.

Scheppach, W., & Weiler, F., (2004), The butyrate story: old wine in new bottles? Butyrate appears to be essential for a wide range of intestinal mucosal health benefits; however, the mechanisms behind this remain to be determined. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, 7, 563-567.

Santi E., Cerioli C., Speroni M., Morlacchini M., Dellaglio F., (1987), Riv. Suinicoltura, 28, 97-101. Saura-Calixto F. J., (1987). Determinación de la composición química de algarroba (*Ceratonia siliqua*), Azúcares, taninos, pectinas y aminoácidos. *Anales de Bromatología*, XXXIX: 81-93

Saura-Calixto F., (1988), Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *J. Food Sci.*, 53, 1769-1771.

Scalbert. A, Williamson. G, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J.Nutr.* , **2000**, 130, 2073-2085.

B. Stavric, T.I. Matula, Flavonoids in food – Their significance for nutrition and health, Birkhauser Verlag, **1992**, p. 274.

C.T. Su, V.L. Singleton, Identification of three flavan-3-ols from grapes, *Phytochem.*, **2001**, 8, 153, 1558.

Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional

aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A

T

Tolentino P., (1950), Mécanismes et limites de l'action thérapeutique de la farine de caroube dans les diarrhées infantiles : étude clinique et expérimentale, *Ann. Paed.* N°175, pp. 200-222

Tanaka R., Takayama H., Morotomi M., Kuroshima T., Ueyama S. et Matsumoto K., (1983), Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human faecal flora. *BifMicroflora.*, Vol. 2, pp. 17-24.

Terada A., Hara h., Kataoka M. et Mitsuoka T., (1992), Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal microbiota. *MicrobEcolHealth Dis.*, Vol. 5, pp. 43 - 50.

Tang, Z. R., Yin, Y. L., Nyachoti, C. M., Huang, R. L., Li, T. J., Yang, C. B., et al., (2005), Effect of dietary supplementation of chitosan and galacto-mannan oligosaccharide on

serum parameters and the insulin-like growth factor-I mRNA expression in early-weaned piglets. *Domestic Animal Endocrinology*, 28, 430e441.

Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl. 2), 393S–398S [[PubMed](#)]

U

Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus vaginalis* suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34

V

Vavilov N.I., (1951). The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants [translated from the Russian by K.S. Chester]. The Ronald Press Co., New York

Vardar Y., Seçurenand Ö. et Ahmed M., (1972), Preliminary results on the chemical composition of the Turkish carob beans, *Qual. Plant Mater*, vol. XXI N°4, pp. 318- 327.

W

Wang, J., Zhang., (2009), L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Res.*, 344, 105–112.

Wang, X., Brown I.L., Khaled D., Mahoney M.C., Evans A.J. et Conway P.L., (2002), Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *J. of Appl Microbiol.*, Vol. 93, pp. 390-397.

Würsch P., (1987), In : «Proceedings of the II Int. Carob Symposium», P. Fito, A. Mulet (Eds), 29 sep-1 oct., Valencia, Consejo Interdepartamental de Agricultura y Pesca, 621-628.

Y

Yu Z., Dahlgren R.A., (2005), Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage, *J. Chem. Ecol.* N°26, pp. 2119 – 2140

Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.*, 3: 194-199.

Z

Zitouni A., 2010. Monographie et perspectives d'avenir du caroubier (*Ceratonia siliqua*) en Algérie. Th. Ing. Agrn, INA, El-Harrach, 201 p.

ANNEXE

Composition du milieu MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, 1960)

Constituants	g
peptone	10
Extrait de viande de bœuf	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Tween 80	1
Hydrogénophosphate de potassium	2
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganese 4 H ₂ O	0,05
H ₂ O	1000
pH	6,4±0,2

Composition du bouillon cœur-cerveille (milieu d'enrichissement)

(Réf, CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)

CONSTITUANTS	g
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur de bœuf	5
Protéose-péptone	10
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2,5
H ₂ O	1000
pH	7,4±0,2

Composition de milieu de culture Mueller Hinton

(Ref. CM0419 Oxoid, biomérieux, France)

CONSTITUANTS	g
Infusion de viande de bœuf	12,5
Hydrolysate de caseine	5
Amidon	10
Agar	2
H ₂ O	1000
pH	7,4±0,2