

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم  
Faculté des Sciences de la Nature et de La Vie  
Département d'Agronomie  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم العلوم الزراعية

## Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques

Option

«Hygiène et Sécurité Alimentaire»

Présenté par :

*Melle Tabet Fatiha*

Sous le thème

### Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de caroube *Ceratonia siliqua* (L.)

*Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels  
et de la Santé (LMBAFS), Université de Mostaganem*



Composition du jury de soutenance

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
Miloud Halbouche	Pr	Président	Université de Mostaganem
Djamil Krouf	Pr	Examinateur	Université d'Oran
Mohammed Benali	Pr	Examinateur	Université de Sidi BelAbbes
Ali Riazi	Pr	Encadreur	Université de Mostaganem

Année Universitaire 2013/2014

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم  
Faculté des Sciences de la Nature et de La Vie  
Département d'Agronomie

كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم العلوم الزراعية

## Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques

Option

«Hygiène et Sécurité Alimentaire»

Présenté par :

*Melle Tabet Fatiha*

Sous le thème

### Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de caroube *Ceratonia siliqua* (L.)

*Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels  
et de la Santé (LMBAFS), Université de Mostaganem*



Composition du jury de soutenance

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
Miloud Halbouche	Pr	Président	Université de Mostaganem
Djamil Krouf	Pr	Examineur	Université d'Oran
Mohammed Benali	Pr	Examineur	Université de Sidi BelAbbes
Ali Riazi	Pr	Encadreur	Université de Mostaganem

Année Universitaire 2013/2014

## **Avant-propos**

*Le présent mémoire a été réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) du Pr. A. Riazi de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.*

*J'exprime ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, le professeur A. Riazi, pour les enseignements qu'il m'a prodigués, l'initiation à la recherche qu'il m'a assurée dans le cadre de la réalisation de ce mémoire et pour la disponibilité dont il a fait preuve malgré ses nombreuses tâches pédagogiques et scientifiques. J'ai beaucoup appris avec vous et je vous en remercie infiniment.*

*Je suis très reconnaissante envers Mr. M. Halbouche, Professeur à l'université de Mostaganem, pour m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance. Je le remercie également pour les enseignements qu'il m'a donnés en année théorique de cette formation de magister.*

*Mes respectueux remerciements s'adressent à Mr. D. Krouf, Professeur à l'université d'Oran, pour avoir accepté d'examiner ce travail à un moment de surcharge professionnelle comme celui-ci.*

*Mes vifs remerciements sont également adressés à mon enseignant de l'année théorique de ce magister, Mr M. Benali, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbes d'avoir accepté d'apporter sa touche scientifique à l'achèvement de ce mémoire en participant à mon jury comme examinateur.*

*J'adresse également toute ma reconnaissance à tous mes enseignants de l'année théorique de cette formation : Mr. A. Dilmi-Bouras, Professeur à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef, Dr H. Ziar, M<sup>elle</sup> Mokhtar, Mr Bekkada.*

*Je remercie également tous mes collègues du LMBAFS pour l'aide et l'accompagnement moral dont ils ont fait preuve à mon égard au cours de mon expérimentation.*

*Je tiens à ce que personne ne se sente pas concerné par ma reconnaissance, et pour cela, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

**F. Tabet, Novembre 2013**

---

**Avant-propos**

## **Dédicaces**

Je dédie ce travail

### **A mes parents**

Pour votre amour ...

Pour tous vos sacrifices...

Pour tous les enseignements que vous m'avez transmis...

En témoignage de mon éternelle reconnaissance ....je vous aime.

A L'ensemble des personnes qui, de près ou de loin, ont permis l'avancée et l'aboutissement de ce travail.

Fatiha, 2013

## Sommaire

### Avant-propos

### Résumé

### Abstract

### Listes des tableaux et figures

### Introduction ..... 2

#### Chapitre I : Revue bibliographique

### I.1. Généralités sur le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*)..... 3

#### I.1.1. Taxonomie..... 3

#### I.1.2. Données botaniques. .... 4

#### I.1. 3. Reproduction biologique ..... 4

#### I.1.4. Origine et répartition géographique ..... 6

##### I.1.4.1. Origine de caroubier..... 6

##### I.1.4.2. Distribution géographique du caroubier ..... 7

#### I.1.5. Intérêts et utilisations du caroubier ..... 8

##### I.1.5.1. L'arbre ..... 8

##### I.1.5.2. Le fruit ..... 8

#### I.1.6. Les polyphénols de caroube..... 11

#### I.1.7. utilisations thérapeutique de la caroube caroubier..... 15

##### I.1.7.1. Traitement de l'hypercholestérolémie..... 15

##### I.1.7.2. Traitement de la diarrhée ..... 16

##### I.1.7.3. Traitement du reflux gastro-œsophagien..... 16

### I.2. Généralités sur la Toxinogénèse..... 16

#### I.2.1. Toxinogénèse..... 16

#### I.2.2. Les toxines..... 17

##### I.2.2.1. Les endotoxines. .... 17

##### I.2.2.2. Les exotoxines..... 19

##### I.2.2.2.1. Les toxines A-B..... 19

##### I.2.2.2.2. Les toxines formant des pores..... 19

I.2.3. Physiologie de quelques bactéries invasives et toxiques .....	20
I.2.3.1. Les Salmonelles.....	20
I.2.3.1.1. Physiopathologie des salmonelloses.....	20
I.2.3.1.1.1. Fièvre typhoïde.....	20
I.2.3.1.1.2. Les intoxications alimentaires à salmonelles.....	21
I.2.3.2. Les Shigelles.....	22
I.2.3.3. Les infections à <i>Escherichia coli</i> .....	23
I.2.3.3.1. Physiopathologie des infections à <i>E. coli</i> .....	23
I.2.3.3.1.1. <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène (ECEP).....	24
I.2.3.3.1.2. <i>Escherichia coli</i> entéro-invasives (ECEI).....	25
I.2.3.3.1.3. <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragiques (ECEH).....	25
I.2.3.3.1.4. <i>Escherichia coli</i> entéro-aggrégatives (ECEAgg).....	25
I.2.3.3.1.5. <i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogène (ECET).....	25
I.2.3.4. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	26
I.2.3.5. <i>Vibrion cholérique</i> .....	26
I.2.3.6. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	28
I.2.3.7. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	28
I.2.3.8. Les brucella.....	28
I.2.3.9. Les Staphylocoques .....	29
I.2.3.9.1. Physiopathologie des infections staphylococciques.....	29
I.2.3.10. Listériose.....	30
I.2.10.1. Physiopathologie de la listériose.....	31
I.2.3.11. Infections à <i>Clostridium</i> .....	32
I.2.3.11.1. Physiopathologie des infections à <i>Clostridium</i> .....	32
I.2.3.11.1.1. <i>Clostridium tetani</i> .....	32
I.2.3.11.1.2. <i>Clostridium botulinum</i> .....	32
I.2.3.11.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> .....	33
I.2.3.12. <i>Bacillus cereus</i> .....	33

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1. Origine du matériel biologique.....	35
---	----

II.1.1. Les souches bénéfiques.....	35
II.1.2. Les bactéries pathogènes.....	35
II.2. Origine des gousses caroube.....	35
II.3. choix des milieux de culture et conditions de croissance.....	36
II.3.1. Choix de milieu de culture.....	36
II.3.2. Les Conditions de croissance.....	36
II.3.2.1. Les bactéries bénéfiques.....	36
II.3.2.2. Les bactéries pathogènes.....	36
II.4. Extraction des polyphénols de caroube.....	37
II.4.1. Préparation et broyage de gousses.....	37
II.4.2. Opération d'extraction.....	37
II.5. Détermination de la matière sèche.....	38
II.6. Dosage des composés phénoliques.....	38
II.7. Dosage des flavonoïdes.....	39
II.8. Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI).....	39
II.9. Mise en évidence le pouvoir antimicrobien d'extrait aqueux de caroube.....	40
II.9.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé.....	40
II.10. Traitement statistiques des résultats.....	40
<b><u>Chapitre III: Résultats et discussion</u></b>	
III.1. Teneur en composés polyphénoliques de la gousse de caroube.....	41
III.1.1. Les polyphénols totaux.....	41
III.1.2. Les flavonoïdes.....	42
III.2. Activité antimicrobienne d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.....	42
III.2.1. Concentration minimale inhibitrice des souches (CMI).....	42
III.3. Effet des extraits aqueux phénolique de gousses de caroube sur la cinétique de la croissances des souches pathogènes et des souches bénéfiques.....	47
III.3.1. Cinétique de viabilité d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	47
III.3.2. Cinétique de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	54
III.3.3. Cinétique de croissance de <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579.....	61
III.3.4. Cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	68

III.3.5. Cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862.....	75
III.3.6. Cinétique de croissance de <i>Shigella sonnei</i> ATCC p4001.....	82
III.3.7. Cinétique de croissance de <i>Bacillus cereus</i> ATCC11778.....	88
III.3.8. Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	94
III.3.9. Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LbRE-LSAS.....	102
III.3.10. Cinétique de croissance de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> Bb12.....	109
<b>Conclusion</b> .....	117
<b>Références bibliographiques</b> .....	119

### Résumé

La présente étude porte, d'une part, sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits phénoliques de gousses de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) récoltées dans la région de Mostaganem sur huit souches pathogènes (*Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), et d'autre part, sur l'effet de ces extraits sur le comportement de deux souches bénéfiques (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12) en utilisant la méthode de diffusion sur disque et en suivant la cinétique d'inhibition. Les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été respectivement déterminés par la méthode Folin-Ciocalteu et par celle au trichlorure d'aluminium dans deux types d'extraits phénoliques de gousses de caroube: l'extrait éthanol-eau (7V/3V) (EEPC) (23,79mg/g) et l'extrait aqueux (EAPC) (32,2 mg/g). C'est la souche *E. coli* ATCC 25922 qui s'est révélé la plus sensible vis-à-vis des extraits phénoliques aqueux de caroube suivie de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001 et de *Bacillus cereus* ATCC 11778, dont les zones d'inhibition varient de 10 à 17mm en présence de 50 mg/mL. La croissance des deux souches bénéfiques LbRE-LSAS et Bb12 a été légèrement améliorée par rapport au témoin en présence de la plus faible concentration d'extrait phénolique utilisée (10 mg/mL) avec un taux maximal d'amélioration de 27%. En revanche, les fortes concentrations de 20 et 50 mg/mL retardent la croissance de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS qui résiste plus que la Bb12 à l'effet inhibiteur des polyphénols. Ces résultats suggèrent l'utilisation de l'extrait phénolique de caroube comme agent conservateur des aliments contre les contaminations bactériennes causées par un bon nombre de pathogènes sans pour autant affecter la croissance des souches bénéfiques ou probiotiques d'intérêt digestif.

**Mots clés :** Caroube-Gousse-Polyphénols-Flavonoïdes-Activité antimicrobienne-Bactéries pathogènes-Bactéries bénéfiques.

### Abstract

The goal of the present study is to explore the antimicrobial activity of phenolic carob pods extract (*Ceratonia siliqua* L.) against eight pathogenic strains (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and also its effect on survival of two beneficial strains (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12). Carob fruits were collected in Mostaganem area. Disk diffusion method was used for the determination of inhibition zone diameter and cell count was monitored during the whole exposure of the strains to the extract. Total polyphenols (Folin-Ciocalteu method) and total flavonoids (method of aluminum trichloride) were determined in the two carob extracts: ethanol-water extract (7v/3v) (EWPC) (23.79 mg/g) and aqueous extract (EAPC) (32.2 mg/g). *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was the most sensitive strain toward the phenolic extract of carob pods followed by *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001, and *Bacillus cereus* ATCC 11778, with an inhibition zone diameter ranging from 10 to 17 mm in the presence of 50 mg/mL carob aqueous phenolic extract. Beneficial strains (LbRE - LSAS and Bb12) growth was slightly improved compared to the control in the presence of the lowest phenolic extract concentration used (10 mg/mL), reaching 27% of maximal biomass improvement. In contrast, the higher phenolic extract concentrations (20 and 50 mg/mL) delay the growth of *Lactobacillus rhamnosus* strain LbRE-LSAS which is the more resistant strain to the inhibitory effect of polyphenols comparatively to Bb12 strain. These results may suggest that phenolic extract of carob could be used as a food preservative agent against a number of pathogens without any significant inhibition of beneficial or probiotic strains of digestive interest.

**Keywords:** Carob-Pod-Polyphenols-Flavonoids, Antimicrobial activity-Pathogenic bacteria-Beneficial bacteria.

## **Liste d'abréviation**

**AMPc:** adénosine monophosphate cyclique

**AlCl<sub>3</sub>:** chlorure d'aluminium

**DO:** densité optique

**g:** gramme

**h:** heure

**log :** logarithme décimale

**MS:** matière sèche

**mL:** millilitre

**mm :** millimètre

**mg:** Milligramme

**Kg :** kilogramme

**UFC:** unité formant colonie

**V:** volume

**%:** pourcentage

**Ø:** diamètre

**°C:** degré Celsius

## Liste des tableaux

	Page
<b><u>Chapitre I: Revue bibliographique</u></b>	
<b><u>Tableau 1:</u></b> Les caractéristiques des endotoxines et des exotoxines.....	<b>18</b>
<b><u>Chapitre III: Résultats et discussion</u></b>	
<b><u>Tableau 2:</u></b> Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	<b>53</b>
<b><u>Tableau 3:</u></b> Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	<b>53</b>
<b><u>Tableau 4:</u></b> Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	<b>60</b>
<b><u>Tableau 5:</u></b> Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	<b>60</b>

- Tableau 6:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche de *Bacillus cereus* ATCC14579 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de Caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 67
- Tableau 7:** Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées /h ou d'inhibition (exprimée en - log de cellules inhibées/h) de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 67
- Tableau 8:** Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 73
- Tableau 9:** Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en - log de cellules inhibées /h) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ ..... 73
- Tableau 10:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 78
- Tableau 11:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 81
- Tableau 12:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Shigella sonnei* ATCC p4001 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... 84

- Tableau 13:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Shigella sonnei* ATCC p4001 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **87**
- Tableau 14:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Bacillus cereus* ATCC11778 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **93**
- Tableau 15:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Bacillus cereus* ATCC11778 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **93**
- Tableau 16:** Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **101**
- Tableau 17:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **101**
- Tableau 18:** La cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **108**

**Tableau 19:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **108**

**Tableau 20:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **116**

**Tableau 21:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **116**

## Liste des figures

	Page
<b><u>Chapitre I: Revue bibliographique</u></b>	
<b>Figure 1:</b> L'arbre du caroubier ( <i>Ceratonia siliqua L</i> ).....	5
<b>Figure 2:</b> Les feuillages, inflorescences et fructification du caroubier monde (Batlle et Tous, 1997).....	6
<b>Figure3:</b> Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).....	9
<b>Figure 4:</b> Distribution du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatique (A.N.R.H, 2004).....	9
<b>Figure 5:</b> La structure du LPS (Charachon, 2007).....	18
<b>Figure 6:</b> physiopathologie de <i>Salmonella typhi</i> (Cuq, 2007).....	21
<b>Figure7:</b> Mécanismes d'interaction des différents pathovars d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées (Anonyme, 2007).....	24
<b>Figure 8:</b> Aspect structural de l'exotoxine cholérique (Cuq, 2007).....	27
<b>Figure 9:</b> La physiopathologie des infections staphylococciques (Cuq, 2007).....	30
<b><u>Chapitre II: Matériels et méthodes</u></b>	
<b>Figure10 :</b> Méthodes d'extraction de polyphénols de caroube (Marston et Hostettmann, 2006).....	38
<b><u>Chapitre III: Résultats et discussion</u></b>	
<b>Figure11:</b> Concentration minimale (mg de polyphénols/mL d'extrait aqueux) inhibitrice (CMI) des souches pathogènes et réaction des souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD...	46

- Figure12:** Diamètre des zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes cultivées en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube après 24h de culture sur milieu solide à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **46**
- Figure13:** Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD ... **49**
- Figure 14:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **50**
- Figure 15:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC25922 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **51**
- Figure 16:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **52**
- Figure 17:** Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 8739 en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3déterminations  $\pm$ SD .... **56**

- Figure 18:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence (10, 20 et 50mg/mL) d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A)** et **4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **57**
- Figure 19:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait Phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A)** et **8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **58**
- Figure 20:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A)** et **12 (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **59**
- Figure21:** Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **63**
- Figure 22:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A)** et **4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **64**
- Figure 23:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A)** et **8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **65**

- Figure 24:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **66**
- Figure 25:** Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD .... **69**
- Figure 26:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A) et 4h(B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **70**
- Figure 27:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h et 8h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD .... **71**
- Figure 28:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD .... **72**
- Figure 29:** Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC33862 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10,20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD..... **77**

- Figure 30:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD ... **78**
- Figure 31:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **75**
- Figure 32:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **79**
- Figure 33:** Cinétique de croissance de *Shigella sonnei* ATCC p 4001 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant **36h** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **83**
- Figure 34:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **84**
- Figure 35:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **85**

- Figure 36:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **86**
- Figure 37:** Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC11778 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10,20 et 50mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant **36h** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **99**
- Figure 38 :** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **90**
- Figure 39:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3déterminations  $\pm$ SD..... **91**
- Figure 40:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD ... **92**
- Figure 41:** Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant **36h** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.... **95**

- Figure 42:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations..... **96**
- Figure 43:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **97**
- Figure 44:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **98**
- Figure 45:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **24h (A) et 36h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD ... **99**
- Figure 46:** Cinétique d'inhibition de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10,20 et 50 mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant **36h** de culture à 37°C  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **103**
- Figure 47:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **104**

- Figure 48:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations v d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **105**
- Figure 49:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **106**
- Figure 50:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **24h (A) et 36h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD ... **107**
- Figure 51:** Cinétique d'inhibition de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10,20 et 50mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant **36h** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **110**
- Figure 52:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **2h (A) et 4h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **111**
- Figure 53:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **112**

**Figure 54:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A) et 12 h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **113**

**Figure 55:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **24h (A) et 36h (B)** de culture à 37°C.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD... **114**

# *Introduction*

## **Introduction**

Les infections bactériennes sont principalement traitées par l'antibiothérapie. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée des antibiotiques a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tannins sont connus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

Le caroubier présente un intérêt de plus en plus grandissant en raison non seulement de sa rusticité, de son indifférence vis-à-vis de la nature du sol, de son bois de qualité, de sa valeur ornementale et paysagère, mais surtout pour ses graines qui font l'objet de transactions commerciales dont la valeur dépasse de loin celle de la production ligneuse. Ainsi, les gousses entières, la pulpe, les graines et la gomme font l'objet d'un commerce important en direction de l'Europe et sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Biner et al., 2007).

La production mondiale annuelle, essentiellement méditerranéenne, est estimée à 310000 tonnes, dont une bonne partie est fournie par l'Espagne suivie de l'Italie, du Portugal du Maroc et de l'Algérie (FAOSTAT, 2010).

La caroube suscite actuellement beaucoup d'intérêt en Algérie, où les industriels se disputent le marché international, en vue de son exportation sous forme de farine tirée de la pulpe et des graines pour leur culture agricole.

Par ailleurs, cet arbre est d'une importance économique considérable; ses gousses, plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière, sont utilisées en industrie agro-alimentaire et pharmacologique, notamment comme anti-diarrhéique, leur richesse en fibres leur confère des vertus hypocholestérolémiantes et hypoglycémiantes; les composés phénoliques qu'elles contiennent sont à l'origine de leur propriétés anti-oxydantes (Hariri et al., 2009).

Ce problème soulevé dans ce travail est quelque part liée aux vertus de ce fruit, et en particulier, au contenu de ses gousses en constituants phénoliques que l'on se propose d'en explorer l'effet antimicrobiens sur huit souches pathogènes (*Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et l'effet sur le comportement de deux souches bénéfiques (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12).

# **Chapitre I**

## ***Revue bibliographique***

## **Chapitre I: Revue bibliographique.**

### **I.1. Généralités sur le caroubier *Ceratonia siliqua* (L.)**

#### **I.1.1. Taxonomie**

Scientifiquement, le caroubier est appelé *Ceratonia siliqua* (Linnée). Ce nom dérive du grec keras et du latin siliqua, faisant allusion à la forme de son fruit qui ressemble à la ‘corne’ de bouc (Bolonos, 1955). Par ailleurs, le nom dialectal kharouv, originaire de l’hébreu, a donné lieu à plusieurs dérivés tels Kharroub en arabe, algarrobo en espagnol, carroubo en italien, caroubier en français, etc... En outre, les graines de caroube, vu leur uniformité, 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 = 205,3mg) (Rejeb, 1995).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des *Leguminosae* (*Fabacae*) de l’ordre des rosales. Toutefois, cette position taxonomique reste litigieuse. Il est généralement placé dans la tribu des Cassieae, sous famille des *Cesalpinoïdae*. Cependant, certains auteurs tels qu’Irwin et Barneby (1981) et Tucker (1992a et b), ont émis des réserves en ce qui concerne la véracité de ce positionnement.

Par ailleurs, des études cytologiques ont révélé que le genre *Ceratonia*, qui possède un nombre total de chromosomes  $2n=24$ , est éloigné des autres membres des *Cassieae* dont le nombre de chromosomes est  $2n=28$  (Goldblatt, 1981; Bureš et al., 2004). En plus, certains auteurs ont désigné *Ceratonia* comme étant l’un des genres les plus archaïques des légumineuses (Tucker, 1992a) et qui serait complètement isolé des autres genres de sa famille (Zohary, 1973).

La seconde espèce du genre, *Ceratonia oreothauma*, décrite par Hillocaot et al. (1980), contient, selon leur origine, deux sous-espèces distinctes: la sous-espèce *oreothauma* qui est native d’Arabie (Oumane) et la sous-espèce *somalensis* qui est native du nord de la Somalie (Batlle et Tous, 1997).

### **I.1.2. Données botaniques.**

L'arbre est dioïque, parfois hermaphrodite et rarement monoïque (Linskens et Scholten, 1980; Batlle et Tous, 1988) (fig.1). Les pieds mâles sont stériles et improductifs (Rejeb, 1995). Les fleurs mâles, femelles et hermaphrodites poussent sur des pieds différents. D'après Tucker (1992a), les fleurs sont initialement bi-sexes et au cours de leur développement, l'une des fonctions sexuelle mâle ou femelle est supprimée.

Les fleurs sont verdâtres, de petite taille (6 à 16 mm de longueur), spiralées et réunies en un grand nombre pour former des grappes droites et axillaires plus courtes que les feuilles à l'aisselle desquelles elles se sont développées (fig. 2) (Batlle et Tous, 1997).

Les fleurs femelles sont constituées d'un pistil court et recourbé avec un petit ovaire (5 à 7mm) bi-carpelle. Les stigmates sont bilobés et couverts par des papilles. A la base, le disque nectarifère est entouré de 5 à 6 sépales rudimentaires. Par contre, la corolle est absente et les fleurs mâles portent 5 étamines (Aafi, 1996).

Les grains de pollen sont ellipsoïdes avec aux pôles 28 à 29  $\mu\text{m}$  de diamètre et à l'équateur 25 à 28  $\mu\text{m}$  (Ferguson, 1980; Linskens et Scholten, 1980) et peuvent germer facilement (Sfakiotakis, 1978).

Le fruit du caroubier (Fig. 2) se développe très lentement nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. Il est de grande taille, 10 à 30 cm de longueur et 2 à 3.5 cm de largeur et indéhiscents après maturité. Il est vert puis brun et au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati, droit ou arqué et présente un tissu pulpeux sucré et rafraîchissant. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm (Batlle et Tous, 1997).

### **I.1.3. Reproduction biologique :**

De nombreux aspects liés à la reproduction biologique du caroubier, tel que la floraison, la compatibilité entre les différents sexes ou encore entre les cultivars, ainsi que la fructification, restent largement inconnus (Batlle et Tous, 1997).

Le caroubier 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 floraison dépendent des conditions climatiques (Batlle et Tous, 1997). Quatre types d'inflorescence décrits par Schroeder (1959) peuvent occasionnellement être rencontrés sur un même arbre:

- les fleurs pistillées,
- les fleurs pistillées avec parfois des fleurs parfaites ou staminées (l'arbre se comporte comme un pied femelle),
- les fleurs parfaites avec parfois des fleurs staminées,
- les fleurs staminées ; la fleur peut démarrer hermaphrodite puis il y a une chute des pistils et la fleur devient staminée du point de vue structure et fonction.



**Figure 1:** L'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)



**Figure 2** : feuillage, inflorescences et fructification du caroubier (Batlle et tous; 1997)

La pollinisation des fleurs du caroubier est, en grande partie, assurée par les insectes (Retana *et al.*, 1990;1994; Rejeb *et al.*, 1991; Ortiz *et al.*, 1996), mais aussi par le vent (Passos de Carvalho, 1988; Tous et Batlle, 1990). Les trois sexes de fleurs, sécrètent des substances nectarifères dont la quantité et la contenance en sucres 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). D'après Haselberg (1996), la variation dans l'intensité d'inflorescence et la production des gousses, est plutôt liée à des facteurs endogènes qu'aux aléas climatiques. Toutefois, des conditions défavorables de l'environnement peuvent entraver, d'une manière significative, la production des fruits (Batlle et Tous, 1997).

#### **I.1.4. Origine et répartition géographique du caroubier**

##### **I.1.4.1. Origine du caroubier**

Le lieu d'origine du caroubier demeure controversé. Toutefois, De Candolle (1983) et Vavilov (1951) ont rapporté qu'il serait natif de la région Est méditerranéenne (Turquie et Syrie). Par contre, Schweinfurth (1894) a insinué qu'il est originaire des pays montagneux du Sud d'Arabie (Yémen). Tardivement, il a été considéré, par Zohary (1973), comme originaire de la flore d'Indo-Malaisie, groupé avec *Olea*, *Laurus*, *Myrtus* et d'autres plantes.

Par ailleurs, *Ceratonia oreoethauma* est la seule espèce connue et originaire du Sud-est d'Arabie (Oumane) et des bordures de la corne africaine (Nord de Somalie) (Hillcoat et al., 1980).

#### **I.1.4.2. Distribution géographique du caroubier**

Selon Hillcoat et al. (1980), le caroubier est étendu, à l'état sauvage, en Turquie, Chypre, Syrie, Liban, Israël, Sud de Jordanie, Egypte, Arabie, Tunisie et Libye avant d'atteindre l'Ouest de la méditerranée. Il a été disséminé par les grecs en Grèce et en Italie et par les arabes le long de la côte Nord de l'Afrique, au Sud et à l'Est de l'Espagne. Dès lors, il a été diffusé au Sud du Portugal et au Sud-Est de France (fig.3).

Le caroubier a été, également, introduit avec succès dans plusieurs autres pays ayant un climat méditerranéen. C'est le cas en Australie, en Afrique du Sud, aux Etats Unis (Arizona, Californie du Sud), aux Philippines et en Iran (Evreinoff, 1947; Batlle et Tous, 1997) (Fig. 3).

Généralement, la distribution des espèces arborescentes, telle que *C. siliqua* est limitée par des stress liés aux froids (Mitrakos, 1981). En effet, l'espèce *C. oreoethauma* qui semble être plus sensible au froid a une répartition restreinte et limitée seulement à Oman et à la Somalie (Hillcoat et al., 1980). Dans les zones basses méditerranéennes (0-500m, rarement 900m d'altitude), le caroubier constitue une essence dominante et caractéristique du maquis des arbres sclérophylles (Zohary et Orshan 1959; Folchi Guillen, 1981).

En Algérie, le caroubier est fréquemment cultivé dans l'Atlas Saharien et il est commun dans le tell (Quezel et Santa, 1962); on le trouve à l'état naturel en association avec l'amandier, *Olea Europea* et le pistachier *Pistacia Atlantica* dans les étages semi-arides chauds, subhumides et humides à une altitude allant de 100 à 1300 m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée; avec une température de 5°C jusqu'à 20°C et une pluviométrie de 80mm à 600mm/an (Rebour, 1968) (fig. 4).

## **I.1.5. Intérêts et utilisation du caroubier**

### **I.1.5.1. L'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 Tous, 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).

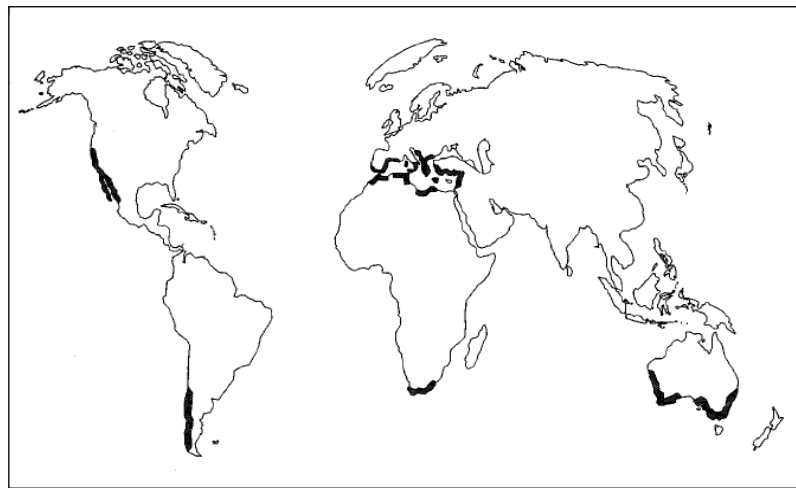
En effet, la fleur est utilisée par les apiculteurs pour la production du miel de caroube, alors que les feuilles sont utiles pour l'alimentation des animaux. L'écorce et les racines sont utilisées en tannerie grâce à leur teneur en tanins. Le bois du caroubier, dur, de couleur rouge, est estimé dans 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 Mert, 2002).

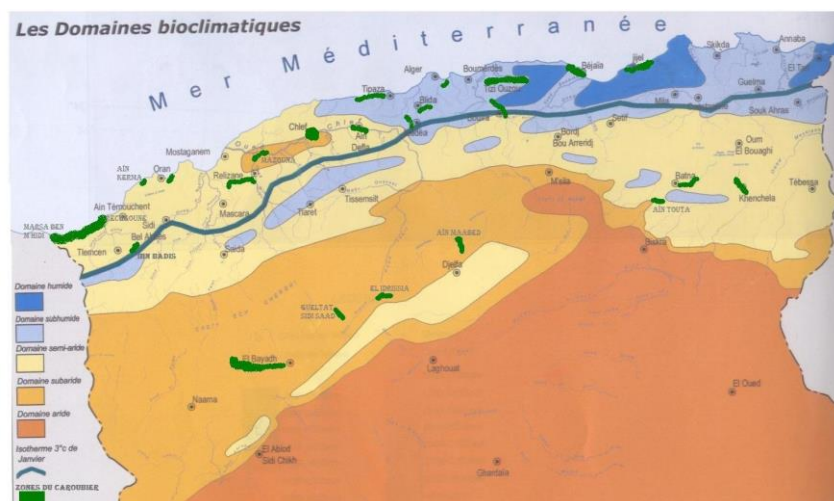
### **I.1.5.2. Le fruit**

Le fruit du caroubier ou la caroube, se compose d'une pulpe enveloppant de 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 semble que la farine de caroube soit



**Figure 3:** Centres d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).



**Figure 4 :** Distribution du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques (A.N.R.H, 2004)

un produit parfaitement adapté à l'alimentation animale. 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, du 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 (Serairi 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, qui a montré que le transit intestinal, la température et le poids de l'enfant s'amélioraient plus vite après administration de la poudre de caroube par voie orale.

Par ailleurs, selon Rejeb (1995), la pulpe est recommandée contre la tuberculose pulmonaire et les affections des bronches. Étant riche en antioxydants (composés phénoliques), en sucres, protéines, fibres, potassium et calcium, la caroube est connue en thérapeutique pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, anti diarrhéique et anti troubles digestifs (Berrougui, 2007).

Une autre étude expérimentale (Ait Chitt et al., 2007) a démontré les capacités bactéricides de la pulpe de caroube vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*; la caroube adsorberait aussi les entérotoxines produites par certaines souches d'*Escherichia coli* et de staphylocoques ainsi que par le vibron cholérique, 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 d'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 Sánchez *et al.* (2010), la caroube est une source bon marché d'hydrates de carbone pour la production de bioéthanol.

La gomme de caroube est extraite de l'albumen des graines de *Ceratonia siliqua* du fait de sa richesse en galactomannanes (unités de  $\beta$ -D-mannose et de  $\alpha$ -D-galactose) (Biner *et al.*, 2007; Avallone *et al.*, 1997). Elle est issue de l'endosperme et constitue le 1/3 du poids total de la graine ; 100kg de graines produisent en moyenne 20kg de gomme pure et sèche (Jones, 1953).

#### **I.1.6. Les polyphénols de caroube**

Les polyphénols se trouvent dans les gousses de caroube sous forme de granules bruns clairs de taille entre 100 et 500 $\mu$ m. Ces granules se trouvent dans la fraction fibreuse de la pulpe de caroube et peuvent être extraits par des solvants polaires (Wursh *et al.*, 1984).

La section d'une gousse de caroube examinée au microscope électronique montre la présence de larges cellules parenchymateuses remplies de granules de tanins ressemblant à des pièces d'ambre en microscopie optique (wursch *et al.*, 1984). L'analyse par diffractions aux rayons X montre que les granules ne possèdent pas de structure cristalline (wursch *et al.*, 1984).

Pour l'analyse des polyphénols, on recommande généralement l'utilisation d'échantillons frais au lieu des échantillons séchés à l'air ou lyophilisés (Harvey, 2001). Okuda *et al.* (1989) démontrent que certains composés phénoliques se décomposent rapidement s'ils sont exposés à la lumière ou à des températures élevées.

Il est à noter que les tanins hydrolysables sont relativement stables à l'air et à température ambiante tandis que les tanins condensés ont tendance à s'oxyder dans les mêmes conditions (Okuda *et al.*, 1989). Les tanins complexes et de grande taille sont facilement dégradés en tannins de plus faible poids moléculaire sous l'action de l'eau, des acides dilués et d'autres solvants comme le méthanol (Harvey, 2001).

Les tannins peuvent être extraits à l'eau (à température ambiante ou à 90 °C) au méthanol 50% (v/v) (à température ambiante ou bouillant) ou au mélange acétone-eau 70/30(4°C ou à température ambiante) (Hagerman, 1988; Waterman et Mole, 1994).

Selon Scalbert (1992), l'étape critique dans l'analyse des tanins est leur extraction. En effet, leur faible solubilité dans les solvants organiques et leur présence en mélanges complexes compliquent la séparation et l'identification des polyphénols de la caroube (Nachtomi et Alumot, 1963).

Une méthode employée par Kumazawa *et al.* (2002), consiste à laisser en contact les gousses de caroube écrasées et séchées préalablement, pendant 12h à l'eau froide (4°C). Ce procédé, répété 2 fois, permet d'éliminer les oses présents. Le résidu est ensuite extrait avec de l'eau bouillante 10 min. Après 12h à température ambiante, l'extrait est filtré, concentré puis séché avant d'être analysé. L'échantillon obtenu représente 10% de la masse des gousses de caroube engagée.

Les résultats de l'analyse des polyphénols en HPLC (Owen *et al.*, 2003) montrent que le rendement est meilleur avec une extraction à l'hexane (pour l'élimination des lipides) puis au méthanol (3h), qu'avec l'eau distillée (18h à température ambiante).

Nishira et Joslyn (1968) séparent les polyphénols extraits au méthanol en deux fractions: L'une soluble dans l'acétate d'éthyle et l'autre soluble dans le butanol. Les polyphénols sont ensuite précipités à l'hexane.

Avallone *et al.* (1997) étudient l'efficacité de différents solvants d'extraction des tanins. L'acétone pure est efficace pour l'extraction des tanins ; tandis que le mélange acétone-eau : 70/30 (V/V) s'avère meilleur que celui de méthanol-eau (50/50 : V/V) car il permet

d'extraire la majorité des polyphénols. Les polyphénols restants dans les résidus sont estimés après catalyse acide dans du butanol additionné de sulfate de fer. Cependant, l'analyse des résidus indique la présence d'une quantité non négligeable de tanins ( $4\pm 0,77$ mg/g) qui n'ont pas été extraits par le mélange acétone -eau.

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 peuvent 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) et les méthodes utilisées pour l'extraction des polyphénols ou leur détermination (Marakis, 1996). Les variétés sauvages sont plus riches en tanins que les variétés cultivées (Marakis, 1993).

Selon Würsch *et al.* (1984), la teneur en tanins condensés des gousses de caroube varie de 16 à 20% de la masse sèche. Saura-Calixto (1988) rapporte aussi une teneur en polyphénols de 19,2% (17,9% de tanins condensés et 1,3% de tanins solubles dans l'eau) dont, 94% font partie des résidus de fibre de caroube.

Avallone *et al.* (1997) constatent que les gousses de caroube renferment plus de tanins condensés (proanthocyanidines) que de tanins hydrolysables (ellagitanins et les gallotanins). En effet, une gousse de caroube contient en moyenne 19mg de polyphénols totaux par g de matière fraîche; 2,75mg/g de tanins condensés et 0,95mg/g de tanins hydrolysables.

plus élevées (40,8mg/g de polyphénols totaux ; 16,2 mg/g de composés se trouvent à l'état de traces dans la graine.

Les polyphénols hautement polymérisés (tannins) de caroube ont une masse moléculaire très élevée rarement rencontrée chez les plantes (Würsch *et al.*, 1984). Près de 50% des tannins ont une masse moléculaire supérieure à 32000 Daltons (Tamir *et al.*, 1971), l'autre moitié se rencontre sous forme de granules de plus haute masse moléculaire (Würsch *et al.*, 1984).

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

Les composés obtenus par les expériences de dégradation avec l'acide thioglycolique ou l'acide chlorhydrique sont (+)-catechine, (-)-epicatechine, (-)-epicatechine gallate, (-)-epigallocatechine gallate, (-)-epigallocatechine, delphinidine, pelargonidine et cyanidine. Ceci indique que les polymères sont constitués de sous unités de flavan-3-ol et de flavan-3,4-diol (Tamir *et al.*, 1971; Marakis *et al.*, 1993; 1997).

Les polyphénols extraits à l'eau se composent de (-)-epigallocatechine, (+)-catechine, (-)-epicatechine gallate, (-)-epigallocatechine gallate, avec l'acide gallique comme constituant le plus abondant (Corsi *et al.*, 2002).

L'extraction au mélange méthanol/acide acétique 0,5% (90/10 : v/v) donne en plus, des glycosides de quercétine et de l'acide ellagique (Sakakibara *et al.*, 2003).

Les gousses vertes de caroube ont fait l'objet de très peu d'études (Nachtomí et Alumot, 1963; Joslyn *et al.*, 1968; Nishira et Joslyn, 1968) comparatives sur le plan de leur composition en polyphénols par rapport aux gousses mûres.

En effet, Joslyn *et al.* (1968) constatent par extraction à l'eau chaude et au méthanol que les gousses vertes contiennent beaucoup plus de polyphénols totaux que les gousses mûres (67mg/g matière sèche pour les gousses mûres et 204,3mg/g matière sèche pour les gousses vertes).

Le principal composé trouvé est la leucodelphinidine ainsi que neuf composés hydrolysables dont deux sont identifiés comme étant le  $\beta$ -D-glucogallin et le  $\beta$ -D-1,6-di-O-galloylglucose (Nishira et Joslyn, 1968).

Ces tanins hydrolysables ne sont pas retrouvés ou sont présents en quantités très faibles dans les gousses mûres (Joslyn *et al.*, 1968). Par contre, on retrouve dans les

gousses mûres une quantité abondante d'acide gallique, supposé dériver des tannins hydrolysables par hydrolyse enzymatique (Joslyn et al., 1968).

Par ailleurs, [Nachtomi et Alumot \(1963\)](#) ont identifié plusieurs catechines et leucoanthocyanines dans les gousses vertes: (+)-gallocatechine, (-)-epicatechine, (-)-epicatechine gallate et (+)-catechine. Ces molécules sont considérées comme les précurseurs possibles des tannins condensés qu'on trouve dans les gousses mures.

### **I.1.7. Utilisation thérapeutique de la caroube**

#### **I.1.7.1. Traitement de l'hypercholestérolémie**

La haute teneur en fibres de la caroube suggère qu'elle pourrait réduire le taux de cholestérol sanguin. En 2010, [Ruiz-Roso et al.](#), ont étudié les effets d'une consommation de fibres de caroube riches en polyphénols sur 88 individus souffrant d'hypercholestérolémie. Les résultats de cette étude indiquent que cette consommation diminue au bout d'un mois les niveaux de cholestérol total (-18%), de LDL cholestérol « mauvais cholestérol » (-26%) et triglycérides (-16%).

Ces résultats concordent avec ceux publiés par [Zunft et al. \(2003\)](#) qui montraient qu'une préparation de pulpe de caroubier de 15 g par jour et riche en polyphénols diminuait au bout de 6 semaines le profil lipidique à raison de -10% de LDL cholestérol et de -11% de triglycérides, chez des individus présentant une hypercholestérolémie. Cet effet bénéfique, comparé à un placebo, était plus marqué chez les femmes. Une autre équipe ([Gruendel et al., 2006](#)) avait précédemment montré qu'un extrait de pulpe de caroube riche en polyphénols augmentait l'oxydation des acides gras, reflétée notamment par une augmentation de la dépense énergétique et les taux de triglycérides mesurés après un repas.

### **I.1.7.2. Traitement de la diarrhée**

Traditionnellement, la caroube est utilisée pour le traitement des affections gastro-intestinales, en particulier les diarrhées. Une étude a montré que différents types de produits à base de caroube comme le jus de caroube associé à une solution de réhydratation orale, réduit la durée des diarrhées chez 80 enfants âgés de 4 mois à 4 ans, comparés à une solution de réhydratation seule (Hostettler et al., 1995).

La fraction insoluble de caroube provenant de la pulpe administrée à raison de 2 g toutes les deux heures pendant 48 heures n'apporterait aucun effet bénéfique chez les voyageurs victimes de diarrhée (Loeb et al., 1989). Dans une autre étude réalisée chez des nourrissons âgés de 3 à 21 mois, un extrait de farine de caroube à raison de 1,5 g/kg/jour, contenant 40% de tannins et 26% de fibres réduirait, au bout de 6 jours de traitement, la période des diarrhées. Cette préparation diminue également les vomissements et aide à retrouver le poids d'origine plus rapidement que chez ceux traités avec le placebo. La préparation était bien tolérée par les nourrissons.

#### **I.1.7.2.1. Traitement du reflux gastro-œsophagien**

La gomme de caroube est un épaississant alimentaire qui pourrait se révéler utile dans le traitement du reflux gastro-œsophagien infantile, selon une étude publiée en 2012 par Conderet. Au cours de cette étude, il a examiné l'effet d'un concentré de gomme de caroube (HL-350) sur 20 nourrissons de moins de 2 mois souffrant de reflux.

Le nombre de régurgitations diminuait chez le groupe ayant reçu la préparation, comparé au groupe contrôle. Cet effet bénéfique confirme les résultats précédents obtenus sur 50 nourrissons ayant bu une préparation contenant du Gaviscon® (un médicament anti-reflux) et de la farine de caroube.

## **I.2. Généralités sur les toxi-infections**

### **I.2.1. Toxinogénèse**

Les bactéries pathogènes produisent de nombreuses substances qui sont toxiques pour leur hôte. Lorsqu'il s'agit de protéines et qu'elles agissent à faibles concentrations, il

s'agit de toxines. Dans certains cas (tétanos et botulisme par exemple), seule la toxine est pathogène et la multiplication du microorganisme ne participe en rien aux symptômes observés (Prescott *et al.*, 2003).

Une toxine du latin (*toxicum*, poison) est une substance spécifique, souvent un métabolite de l'organisme, qui nuit à l'hôte (Charachon, 2007). Une toxine est plus ou moins immunogène, capable de tuer à faibles doses en bloquant une fonction essentielle de l'organisme et en agissant sur une cible généralement spécifique.

### **I.2.2. Les toxines :**

Il existe deux types de toxines, les endotoxines et les exotoxines

#### **I.2.2.1. Les endotoxines :**

Ce sont des toxines fabriquées par une bactérie mais qui restent localisées en son sein comme un élément structural. C'est le cas des bactéries Gram-négatif. La plupart des bactéries Gram-négatif ont, dans la membrane externe de leur paroi, un lipopolysaccharide (LPS) qui, dans certaines circonstances, est toxique pour les hôtes spécifiques. Une certaine quantité est libérée pendant la multiplication bactérienne) (Charachon, 2007).

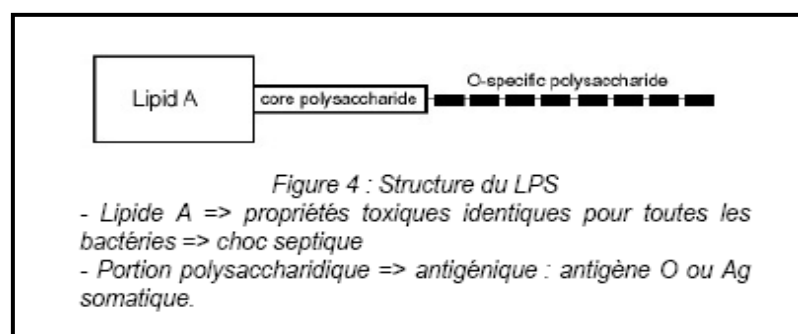
Selon Prescott *et al.* (2003), les endotoxines sont thermostables; toxiques uniquement à concentrations élevées; faiblement immunogènes; et habituellement capables d'induire des effets systémiques: de la fièvre (pyrogène), un état de choc, une coagulation sanguine, un état de faiblesse, une diarrhée, une inflammation, une hémorragie intestinale et une fibrinolyse.

Le LPS est un constituant de la membrane externe de la paroi des bactéries à gram négatif. Il est composé d'une partie lipidique (lipide A) et d'une partie polysaccharidique (core central et chaînes polysaccharidiques) (figure 5) (tableau 1) (Charachon, 2007).

La fraction glucidique phosphorylée et ramifiée n'est ni toxique ni antigénique et possède une fonction haptène dont la spécificité est celle de l'antigène O.

La lipoprotéine comporte un polypeptide de 18 acides aminés et est antigénique.

Le **lipide A** est un glycophospholipide riche en glucosamine; il possède les propriétés biologiques de l'endotoxine et a des effets pyrogènes et létaux.



**Figure 5:** structure du lipopolysaccharide (LPS) (Charachon, 2007)

**Tableau 1:** Caractéristiques des endotoxines et des exotoxines (Charachon, 2007)

Caractéristiques	Exotoxines	Endotoxines
Composition chimique	Protéines souvent à deux composants (A et B)	lipopoly-saccharidique de la membrane externe (lipide A qui toxique).
Exemples de maladies	Botulisme, diphtérie, tétanos	Infections à bactéries Gram-négatives
Effets sur l'hôte	Très variable selon la toxine.	Similaire pour toutes les endotoxines.
Fièvre	Ne donne généralement pas de fièvre.	Donnent de la fièvre par libération d'intrleukine-1
Génétique	Souvent portés par des gènes extra-chromosomiques.	Produites à partir de gènes chromosomiques
Stabilité à la chaleur	Sensibles pour la plus part et inactivée entre 60-80 °C.	Résistantes sur la chaleur
Localisation	Généralement excrétés hors de la cellule bactérienne.	Partie de la membrane externe des bactéries Gram-négatives.
Production	Produites par des bactéries Gram-positive et négatives.	Présents seulement chez les bactéries Gram-négatives, libérés à la mort de la bactérie, certains libérés pendant la croissance.
Toxicité	Extrêmement toxiques et fatales en quantité du l'ordre du	Faiblement toxique

### **I.2.2.2. Les exotoxines:**

Selon Prescott *et al.* (2003), ce sont des toxines (protéines) synthétisées par les bactéries qui les excrètent dans le milieu extérieur. Les exotoxines sont de nature protéiques solubles, thermolabiles, habituellement libérées dans l'environnement pendant la multiplication de la bactérie pathogène. Dans de nombreux cas, les exotoxines peuvent voyager du site d'infection vers d'autres tissus ou cellules cibles.

Les exotoxines sont la plus part des protéines synthétisés par des bactéries spécifiques contenant souvent un plasmide ou un prophage porteur des gènes de l'exotoxine, thermolabiles (inactivées entre 60 et 80 °C), fortement immunogènes pouvant stimuler la production d'anticorps neutralisants ( antitoxines, non pyrogènes, associées avec des maladies spécifiques avec un mode d'action propre, et enfin souvent désignées par le nom de la maladie qu'elles induisent ( exemple : toxine diphtérique ou botulique) .

#### **I.2.2.2.1. Les toxines A-B :**

Ce type de toxines a deux composants, la sous-unité B qui est responsable de l'interaction avec les cellules de l'hôte et la sous-unité A qui contient l'activité enzymatique (toxique). Cette activité varie d'une toxine à l'autre et peut être une activité ADP ribosylante (toxine cholérique, toxine pertussique et toxine diphtérique) ou une activité protéolytique (toxine tétanique ou toxine botulinique). La sous-unité B varie d'une toxine à l'autre et est responsable des spécificités tissulaires (Charachon, 2007).

#### **I.2.2.2.2. Les toxines formant des spores**

Une famille de toxines est responsable de la formation de spores conduisant à la lyse cellulaire. A titre d'exemple, il s'agit de l'hémolysine d'*Escherichia coli*, de la listériolysine (hémolysine) de *Listeria monocytogenes* (Charachon, 2007).

Par ailleurs, beaucoup de bactéries pathogènes produisent des enzymes

hydrolytiques telles que les protéases, DNAses, collagénases qui vont participer à la formation des lésions au siège de la multiplication bactérienne (Charachon, 2007).

### **I.2.3. Physiologie de quelques bactéries invasives et toxiques:**

#### **I.2.3.1. Les Salmonelles:**

Ce sont des entérobactéries de forme bacillaire à Gram négatif, mobiles (ciliature péritriche), aéro-anaérobies facultatifs, oxydase négative, nitrate réductase positive, fermentative du glucose, lactose négative et à forte contagiosité (Guiraud, 1998).

Ces entérobactéries sont essentiellement présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Dans le genre *Salmonella*, plus de 2000 sérotypes sont actuellement décrits, tous présumés pathogènes pour l'homme (Berche et al., 1988).

Quatre de ces sérotypes, correspondant aux espèces *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B et C, sont à l'origine de maladies infectieuses appelées fièvres typhoïde ou paratyphoïdes. En ce qui concerne les toxi-infections d'origine alimentaire, *Salmonella enteridis* est l'espèce la plus fréquemment impliquée (Cuq, 2007).

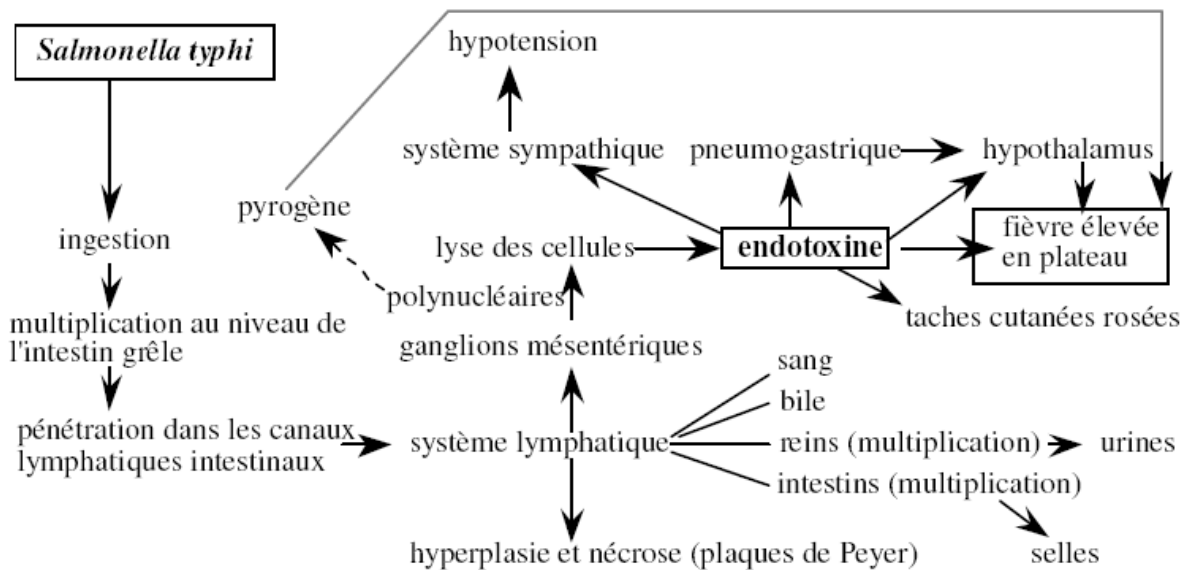
#### **I.2.3.1.1. Physiopathologie des salmonelloses**

##### **I.2.3.1.1.1. Fièvre typhoïde**

La contamination se fait par absorption d'eau contaminée par les selles d'un malade ou d'un porteur sain. Les bactéries ayant résisté à l'acidité gastrique pénètrent l'épithélium intestinal, auquel elles adhèrent. Les salmonelles traversent l'épithélium pour atteindre la sous-muqueuse (fig.6). Elles induisent une réaction inflammatoire avec afflux de polynucléaires et de macrophages qui phagocytent les bactéries (ce qui entraîne une fièvre et douleurs musculaires). Cependant, les salmonelles croissent dans le cytoplasme de ces cellules et les détruisent (Berche et al., 1988).

La présence d'une capsule très mince constituée d'antigène Vi est responsable de cette résistance à la phagocytose. Les salmonelles gagnent les ganglions mésentériques, s'y multiplient et se propagent dans la circulation sanguine, cette bactériémie peut entraîner des localisations métastatiques (méningite, arthrite....).

De plus la réaction immunitaire spécifique permet un relargage d'endotoxine dans la circulation qui explique les troubles neurologiques, les lésions rénales, les lésions des plaques de Payer et des ulcérations de la muqueuse intestinale (Berche et al., 1988).



**Figure 6:** Physiopathologie de *Salmonella typhi* (Cuq, 2007).

#### I.2.3.1.1.2. Les intoxications alimentaires à salmonelles.

Les malades sont habituellement infectés par des aliments provenant des animaux infectés ou contaminés par eux (Berche et al., 1988). Les bactéries envahissent les cellules

épithéliales puis la sous muqueuse, déterminant ainsi une réaction inflammatoire dans les tissus du tube digestif.

Contrairement à la fièvre typhoïde, les bactéries restent localisées dans la sous-muqueuse et les ganglions mésentériques dans lesquels elles sont détruites par la phagocytose. Cette réaction inflammatoire entraîne de la fièvre, des vomissements et une diarrhée aqueuse (Berche *et al.*, 1988).

Certains sérotypes secrètent des entérotoxines thermolabiles capables d'activer l'adényl cyclase des entérocytes entraînant ainsi la fuite ionique et hydrique. Seules les bactéries invasives déclenchent la diarrhée, car l'inflammation intense induisant une forte production de prostaglandines qui sont des puissants activateurs de l'adényl cyclase, l'AMP cyclique produit induit la fuite d'eau et d'électrolytes des entérocytes (Prescott *et al.*, 2003).

### **I.2.3.2. Les Shigelles**

Ce sont des bacilles Gram négatifs, immobiles, dépourvus de spores et de capsules. Les bactéries du genre *Shigella*, sont des *Enterobacteriaceae* pathogènes strictes, rencontrées exclusivement chez l'homme. L'espèce *Shigella dysenteriae* est responsable de la dysenterie bacillaire. Les *Shigelles* sont des bactéries très proches d'*Escherichia coli* (Guiraud, 1998).

Les microorganismes sont ingérés avec de l'eau ou des aliments contaminés par les selles d'un malade ou d'un sujet porteur sain. La dose infectante est très faible (Berche *et al.*, 1988). Après avoir franchi l'estomac, les bactéries se multiplient dans la lumière de l'intestin et colonisent l'épithélium et l'iléon terminal et surtout le colon. Elles pénètrent dans les cellules des cryptes de leiberkuhn par phagocytose active des bactéries par ces cellules.

Après lyse de la vacuole de phagocytose par une hémolysine de contact, les germes se multiplient dans le cytoplasme des cellules coliques qu'elles détruisent et se propagent ainsi dans les cellules adjacentes. C'est le phénomène de translocation bactérienne.

L'envahissement de la muqueuse colique par la bactérie entraîne une réaction inflammatoire intense avec infiltration du tube digestif par de nombreux polynucléaires qui forment des micro abcès dans la muqueuse, les ulcérations superficielles de la muqueuse entraîne des saignements (Berche et al., 1988) .

### **I.2.3.3. Les infections à *Escherichia coli***

*Escherichia coli*, ou colibacille est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. C'est un coliforme fécal, généralement commensal. Cependant, certaines souches peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.

Cette Entérobactérie est un bacille Gram-négatif. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) (Guiraud, 1998).

#### **I.2.3.3.1. Physiopathologie des infections à *E. coli***

Les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques des infections à *Escherichia coli* ont très rapidement progressé mettant en évidence la très grande diversité des facteurs de virulence de cette espèce (fig7) (Anonyme, 2007).

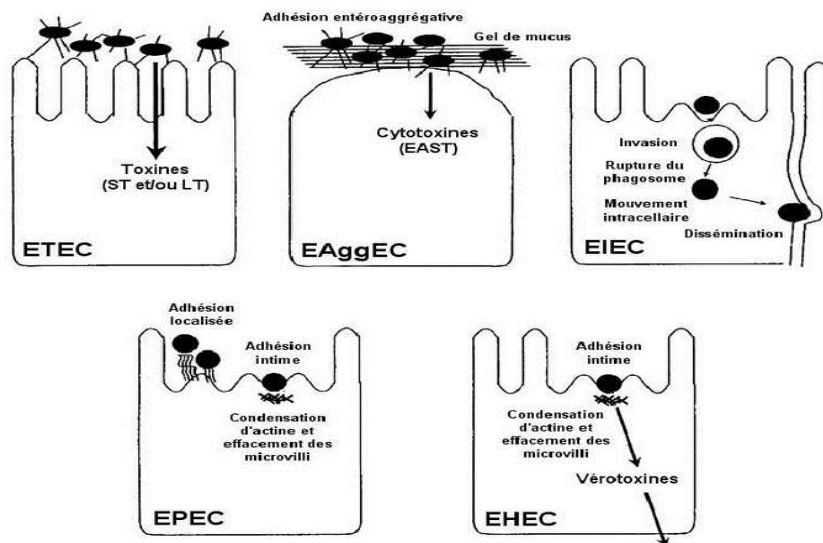
Sur la base du mode d'interaction et des signes cliniques de l'infection, les souches d'*Escherichia coli* inductrices de diarrhées peuvent être classées en cinq pathovars: *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et *E. coli* entéroaggrégatives (EAaggEC).

Outre les *E. coli* induisant des diarrhées, on distingue aussi le pathovar des *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) impliquées dans des affections non-intestinales: infections urinaires, méningites, septicémies, mammites... (Prescott et al., 2003).

Après l'étape initiale d'adhésion et de colonisation, les colibacilles développent différentes stratégies; les ETEC, EA<sub>g</sub>EC et EHEC produisent des toxines. Les EIEC envahissent la muqueuse colique et induisent une réponse inflammatoire destructrice. Les EPEC et EHEC remanient localement le cytosquelette en adhérant intimement à la membrane cellulaire et détruisent les microvillosités environnantes (Prescott et al., 2003).

#### 1.2.3.3.1.1. *Escherichia coli* entéro-pathogène (ECEP).

Les souches d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes se fixent à la bordure en brosse de l'épithélium intestinal sans l'envahir et causent des dommages particuliers appelés lésions éffaçantes. Ces lésions éffaçantes sont la marque d'une destruction des microvillosités de la bordure en brosse au voisinage de la bactérie fixée.



**Figure 7:** Mécanismes d'interaction des différents pathovars d'*E. Coli* responsables de diarrhées (Anonyme, 2007).

Cette destruction cellulaire entraîne la diarrhée. Ces souches d'*Escherichiacoli* sont connues comme adhérentes-effaçantes et considérées comme responsables des diarrhées infantiles. Elles peuvent produire une cytotoxine capable de lyser les cellules véro (VT), toxine apparente à la toxine dysentérique (Shiga-like toxin 1 ou SLT 1).

#### **I.2.3.3.1.2. *Escherichia coli* entéro-invasives (ECEI).**

Elles sont la cause de diarrhées parce qu'elles pénètrent et se multiplient à l'intérieur des cellules de l'épithélium intestinal. Cette propriété invasive est associée à la présence d'un plasmide. Les bactéries provoquent une réaction inflammatoire intense avec des micro-abcès dans la muqueuse. Certaines produisent aussi une cytotoxine et une entérotoxine (Prescott et al., 2003).

#### **I.2.3.3.1.3. *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (ECEH).**

Elles sont à l'origine de diarrhées hémorragiques, il s'agit d'une colite ischémique aiguë qui pourrait être à lier à la sécrétion en quantité abondante d'une cytotoxine SLT (vérotoxine ou Shiga-Like Toxine) le syndrome hémolytique est due aux effets de cette cytotoxine sur l'endothélium des vaisseaux (Prescott et al., 2003).

#### **I.2.3.3.1.4. *Escherichia coli* entéro-aggrégatives (ECEAgg).**

Elles adhèrent aux cellules épithéliales dans certaines régions formant des amas de bactéries comme des briques empilées. Aucune toxine extracellulaire n'a été identifiée chez ces souches, cependant le type unique de lésions dans les cellules épithéliales suggère l'implication de toxine (Prescott et al., 2003).

#### **I.2.3.3.1.5. *Escherichia coli* entéro-toxinogène (ECET).**

Comme les souches ECEP, ces bactéries n'envahissent pas la muqueuse intestinale mais la colonisent en surface grâce à des adhésines (habituellement des pili) codés par des

plasmides et dénommés facteurs de colonisation (colonization factor antigen ou CFA). Elles produisent une ou deux entérotoxines responsables de diarrhées et qui diffèrent par leur stabilité à la chaleur: l'entérotoxine thermostable (ST) et l'entérotoxine thermolabile (LT) (Prescott et al., 2003).

L'enterotoxine ST se fixe à un récepteur glycoprotéique couplé à la guanylate cyclase et situé à la surface des cellules épithéliales de l'intestin. L'activation de la guanylate cyclase stimule la production de la guanidine monophosphate cyclique (GMPc), ceci entraîne la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans le lumen de l'intestin grêle donnant des diarrhées liquides.

L'entérotoxine LT se fixe à des gangliosides spécifiques à la surface des cellules épithéliales et active l'adényl cyclase fixée membranaire, ce qui augmente la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) par le même mécanisme que celui de la toxine cholérique. Il résulte une hypersécrétion d'eau et d'électrolytes dans le lumen intestinal (Prescott et al., 2003) .

#### **I.2.3.4. *Yersinia enterocolitica*.**

*Yersinia enterocolitica* est un bacille à Gram négatif de 1,3 à 3,5 µm de longueur sur 0,5 à 1,0 µm de diamètre (Guiraud, 1998).

Après pénétration par voie orale, les microorganismes traversent l'estomac où ils sont en grande partie détruits. Les bactéries survivantes gagnent l'intestin et adhèrent aux entérocytes, puis pénètrent dans les cellules épithéliales. Elles vont se localiser dans les follicules lymphoïdes des plaques de Peyer ou de l'appendice où elles causent des ulcérations et des hémorragies. La plupart de ces bactéries sont responsables des infections humaines et sécrètent une entérotoxine thermostable (Berche et al., 1988).

#### **I.2.3.5. *Vibrio cholérique*.**

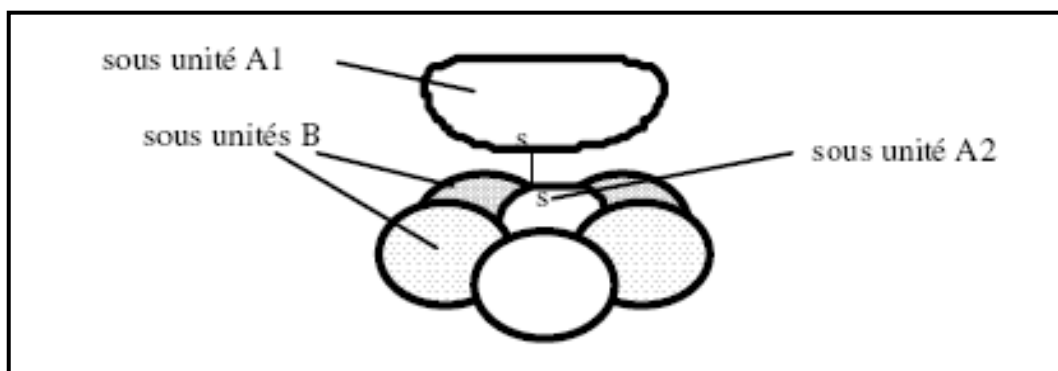
La bactérie *Vibrio cholerae* (vibron cholérique ou bacille virgule en français) est

une bactérie Gram négatif, en forme de bâtonnet incurvé, mobile et responsable du choléra chez l'Homme, une maladie épidémique contagieuse (Guiraud, 1998). Les vibrions cholériques sont absorbés par voie buccale, et la plupart sont détruits par l'acidité gastrique. Cependant, les bactéries qui franchissent la barrière gastrique se multiplient rapidement dans la lumière intestinale avant de pénétrer la muqueuse qui protège les entérocytes pour

adhérer à la bordure en brosse et sécréter une entérotoxine protéique qui provoque une fuite massive d'eau et d'électrolytes, la déshydratation qui en résulte peut être mortelle (Berche *et al.*, 1988).

Cette toxine thermolabile agissant à des doses très faibles, est une protéine polymérique dont la masse moléculaire est de 80 000 daltons et dont la structure est représentée à la figure 8 (Cuq, 2007). C'est la sous-unité A1 qui entre dans la cellule "aidée" par les sous-unités B. Cette sous-unité A1 active l'adénylate cyclase entérocytaire de façon irréversible (Prescott *et al.*, 2003).

L'AMPC intracellulaire produit par l'enzyme à partir de l'ATP modifie le métabolisme. Au niveau des cellules de Lieberkhun de la crypte, il induit une augmentation de la sécrétion d'anions tandis qu'au niveau des cellules apicales de la villosité, l'absorption du chlore et du sodium est inhibée. L'eau accompagnant le transfert de ces ions est excrétée vers la lumière intestinale (Berche *et al.*, 1988).



**Figure 8:** Aspect structural de l'exotoxine cholérique (Cuq, 2007)

#### **I.2.3.6. *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter* est un bâtonnet courbé Gram négatif trouvé dans le tube digestif d'animaux. Ces bactéries sont transmises aux humains par les aliments, l'eau contaminée ou encore par contact avec les animaux infectés (Guiraud, 1998).

Au cours de la période d'incubation (2 à 15 jours). *C. jejuni* envahit l'épithélium de l'intestin grêle causant une inflammation et secrète également une exotoxine qui est similaire du point de vue antigénique à la toxine cholérique. Les symptômes comportent une diarrhée, une fièvre élevée, une inflammation importante de l'intestin est accompagnée d'ulcérations et de selles sanguinolentes (Prescott et al., 2003).

#### **I.2.3.7. *Haemophilus influenzae***

Les cellules sont des coccobacilles ou de petits bâtonnets immobiles à Gram négatif et les souches virulentes sont fréquemment encapsulées, mais la capsule est difficilement visible.

L'infection commence par la colonisation de la muqueuse des voies respiratoires par une souche virulente capsulée suivie d'un envahissement bactérien entraînant une inflammation aigue par dissémination aux ganglions lymphatiques régionaux et parfois passage sanguin. La multiplication des bactéries dans le liquide céphalo-rachidien entraîne une leptoméningite avec invasion des vaisseaux de la pie-mère et thromboses veineuses (Berche et al., 1988).

#### **I.2.3.8. Les brucelles**

Les bactéries du genre *Brucella* sont de très petits coccobacilles à Gram négatif. La bactérie est immobile, non encapsulée, non sporulée et aérobie stricte. Il en existe plusieurs espèces dont quatre sont pathogènes pour l'Homme : *B. melitensis*, *B. abortus bovis*,

*B. suis* et *B. canis*. Elles engendrent une brucellose, maladie animale et humaine (Guiraud, 1998).

Les germes pénètrent à travers le revêtement cutano-muqueux (excoriations cutanées, conjonctives), par voie digestive (lait ou fromage frais contaminé), ou pulmonaire (aérosols contaminés). Ils sont drainés par voie lymphatique vers le premier relais ganglionnaire, dans certains cas les brucelloses sont éliminées par les macrophages et la maladie est inapparente.

Dans d'autres cas, la majorité des bactéries sont détruites par des macrophages, mais certains sont capables de résister, voire de croître dans les cellules, les bactéries peuvent passer dans la circulation générale et essaimer dans tout l'organisme en se localisant dans les phagocytes. Des cellules T spécifiques interviennent et augmentent l'activité bactéricide intrinsèque des macrophages et, en provoquant un afflux local de cellules mononucléées provenant de la moelle osseuse, les *brucelles* sont capables d'empêcher l'action des cellules T spécifiques (Berche et al., 1988).

#### **I.2.3.9. Les Staphylocoques**

Le genre *Staphylococcus* est une bactérie du genre : coque, gram positif arrondie, en amas réguliers ou par deux, de 0,7 à 1 µm de diamètre, immobiles, dépourvus de spores et de capsules. Elles apparaissent le plus souvent en amas dits en grappes de raisin et sont coagulase positive pour *Staphylococcus aureus*, négative pour les autres.

Une vingtaine d'espèces de la famille de staphylocoques sont actuellement identifiées, dont l'espèce principale : *Staphylococcus aureus*, responsable de nombreuses infections humaines et animales (Guiraud, 1998).

##### **I.2.3.9.1. Physiopathologie des infections staphylococciques.**

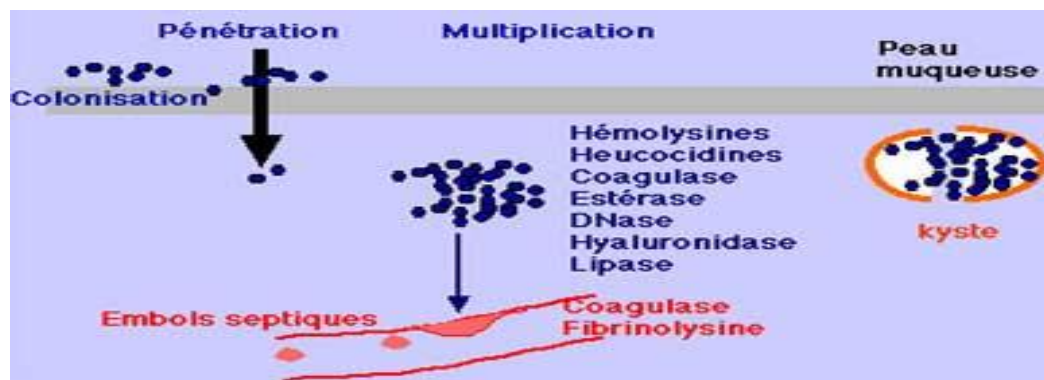
La prolifération de *Staphylococcus aureus* sur la peau et les muqueuses, et l'envahissement tissulaire qui en résulte, est favorisée par des facteurs locaux ou généraux.

Toute lésion même minime du revêtement cutano-muqueux peut permettre la colonisation des tissus par les staphylocoques dorés de la flore commensale (traumatismes, blessures, brûlures, incision chirurgicales...), quel que soit le mécanisme initiateur (fig.9).

Les lésions tissulaires sont caractérisées par une réaction inflammatoire intense avec recrutement de très nombreux leucocytes au contact de la prolifération microbienne. Ces lésions évoluent vers des nécroses avec tendance à l'abcédation. La virulence de ces bactéries est due à la sécrétion de nombreuses toxines et enzymes (Berche *et al.*, 1988).

Certaines toxines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou staphylosines) ont un effet dermo-nécrotique et anti-phagocytaire. Les leucocidines détruisent les polynucléaires (Cuq, 2007).

Les enzymes extra-cellulaires comme la Staphylocoagulase responsable de la formation de caillot endoveineux. Les lipases, estérases, désoxyribonucléases jouant un rôle dans la diffusion tissulaire des staphylocoques, la catalase qui protège les bactéries contre l'effet de  $H_2O_2$  sécrété par les phagocytes (Cuq, 2007).



**Figure 9:** La physiopathologie des infections staphylococciques (Cuq, 2007).

Certaines infections digestives ne résultent pas des infections vraies avec multiplication bactérienne *in situ*, mais de l'ingestion massive de toxines thermostables et résistantes aux enzymes digestives.

Six types d'entérotoxines sont actuellement connus (**A, B, C, D, E et F**) et elles déclencheraient des troubles digestifs par action sur le système nerveux central. Les symptômes de cette maladie, qualifiée parfois de maladie des banquets, sont caractéristiques: salivation abondante, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée abondante, sueurs, céphalée, état de prostration et quelquefois fièvre (Berche et al., 1988).

#### **I.2.3.10. Listériose**

Le genre bactérien *Listeria* est à Gram-positif et il s'agit d'un bacille de petite taille, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif, ubiquitaire (sol, végétaux, eau), possédant une catalase et mobile à 20 °C. Parmi les huit espèces de *Listeria*: *L. denitrificans*, *L. innocua*, *L. murrayi* ou *grayi* ne sont pas pathogènes, tandis que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. welshimeri* et surtout *L. monocytogenes* provoquent des maladies infectieuses chez l'homme (Guiraud, 1998).

Toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ne sont pas obligatoirement pathogènes, mais toutes les souches pathogènes sont hémolytiques et produisent une hémolysine. Un autre facteur associé au pouvoir pathogène est la production d'une protéine de 60 000 Da et d'une phospholipase.

Les symptômes de la listériose se traduisent par une fièvre, une céphalée, des nausées, des vomissements, une pharyngite, des douleurs musculaires, une monocytose, une méningite, des lésions externes, une septicémie, des avortements (Berche *et al.*, 1988).

#### **I.2.3.10.1. Physiopathologie des listérioses.**

Les *Listeria* traversent la membrane intestinale et sont pour la plupart phagocytées par des macrophages. Cette entrée dans le macrophage est liée à la présence de deux facteurs : les internalines InIA et InIB. Les lysosomes se déversent alors dans la vacuole de phagocytose.

La multiplication bactérienne s'arrête mais les *Listeria* vivantes produisent une listériolysine O, qui détruit la membrane du phagosome. Les *Listeria* entrent alors au contact du cytoplasme du macrophage et se multiplient à nouveau, le macrophage étant détruit par ses propres lysosomes. Les *Listeria* se retrouvent dans le sang puis le foie, la rate et même le cerveau (Cuq, 2007). Simultanément à cette phase, la bactérie synthétise des filaments d'actine qui forment une structure en « comète », ce qui engendre une force motrice nécessaire au mouvement de la bactérie (gène ActA).

Les *Listeria* progressent dans le cytoplasme et au contact de la membrane cellulaire induisent une invagination qui conduit à la pénétration dans une nouvelle cellule hôte avec une vésicule entourée de deux membranes plasmiques. Ces membranes sont lysées par une lécithinase (gènes PicB et mpl). Cette transmission de cellule à cellule permet à la bactérie de contourner les défenses de l'hôte (anticorps circulants, complément) (Cuq, 2007).

L'organisme réagit alors en activant ses macrophages et un nombre plus élevé de lysosomes se déverse dans la vacuole et les *Listeria* meurent. Chez les immunodéprimés ou chez le fœtus et certains malades, cette réaction n'intervient pas, les *Listeria* se développent et causent des encéphalites (Cuq, 2007).

### **I.2.3.11. Infections à *Clostridium***

Selon Guiraud (1998), Le genre *Clostridium* est un genre bactérien regroupant des bacilles Gram positifs anaérobies souvent sporulés, anaérobies strict pour la plupart, mobiles en général par l'intermédiaire de flagelles péritriches.

Le genre *Clostridium* comporte de nombreuses espèces dont certaines hautement pathogènes pour l'homme. Les plus « célèbres » espèces sont :

- *Clostridium tetani*, l'agent du tétanos : le bacille du tétanos libère des toxines qui attaquent le système nerveux central et l'individu présente dès lors des paralysies.
- *Clostridium botulinum*, l'agent du botulisme.
- *Clostridium perfringens* retrouvé dans certaines plaies gangréneuses (gangrène gazeuse) ou dans des intoxications alimentaires.
- *Clostridium difficile* qui peut être responsable de la colite pseudomembraneuse.

#### **I.2.3.11.1. Physiopathologie des infections à *Clostridium***

##### **I.2.3.11.1.1. *Clostridium tetani***

Des spores de *Clostridium tetani* sont introduites dans l'organisme par une lésion cutanée, si la tension d'oxygène est suffisamment basse, les spores peuvent germer, lorsque la bactérie meurt et sont lysées, pour éliminer une neurotoxine, la tétanospasmine bloque les synapses inhibitrices des neurones moteurs de la moelle épinière en empêchant les libérations des médiateurs de l'inhibition, l'acide gamma-aminobutyrique et la glycine, ceci résulte en une stimulation incontrôlée des muscles squelettiques. Il en résulte une paralysie spastique (Prescott et al., 2003).

##### **I.2.3.11.1.2. *Clostridium botulinum***

Les clostridies croissent dans les aliments dépourvus d'oxygène et produisent la toxine.

Les neurotoxines produites par *Clostridium botulinum* sont responsables à elles seules de l'ensemble des manifestations du botulisme. Il existe sept neurotoxines botuliniques immunologiquement distinctes (B, C, D, E, F et G). La toxine produite dans l'intestin bloque la libération de l'acétyl choline à la jonction neuromusculaire, les muscles ne se contractent pas en réponse à l'activité des neurones moteurs et il en résulte une paralysie (Prescott et al., 2003).

#### **I.2.3.11.1.3. *Clostridium perfringens***

Selon Prescott et al., (2003), le développement des clostridies se fait dans les plats de viandes réchauffés, l'entérotoxine est produite au cours de la sporulation dans l'intestin.

**Toxines majeures** (létales et nécrosantes)

- $\alpha$  : phospholipase C: lyse des membranes cellulaires
- $\beta$  et  $\epsilon$  : augmente la perméabilité vasculaire (gangrène gazeuse)

**Entérotoxines et enzymes:**

- $\delta$ : Létale, nécrosante et hémolytique  $\delta$
- $\theta$ : Hémolysine SH-dépendante  $\theta$
- $\kappa$ : Procollagénase
- $\lambda$ : Protéase
- $\mu$ : Hyaluronidase  $\mu$

#### **I.2.3.12. *Bacillus cereus***

Les *Bacillus* sont Gram positif, de forme bacille, elles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables (Guiraud, 1998). Le germe *Bacillus cereus*, retrouvé de manière ubiquitaire dans le sol, est fréquemment responsable d'intoxications alimentaires opportunistes (Guiraud, 1998).

La prolifération importante du germe est toujours nécessaire pour que la toxicité se manifeste de  $10^5$  à  $10^9$  germes par g. Le plus souvent, les purées de pommes de terre, les pâtisseries, les viandes diverses, le riz cuit à l'avance, sont à l'origine de cette maladie. L'entérotoxine est produite dans les aliments ou dans l'intestin suite à la croissance de *Bacillus cereus* (Berche et al., 1988). Deux types d'atteintes sont possibles: la première est caractérisée par des vomissements très violents qui apparaissent rapidement. La deuxième se traduit par une diarrhée abondante avec douleurs abdominales apparaissant une dizaine d'heures après le repas incriminé. Deux toxines ont été décrites comme étant à l'origine de ces syndromes: une entérotoxine protéique qui est le facteur diarrhéique et une toxine polypeptidique qui est le facteur émétique (Cuq, 2007).

# **Chapitre II**

## ***Matériels et méthodes***

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

### **II.1. Origine du matériel biologique**

#### **II.1.1. Les souches bénéfiques**

*Bifidobacterium animalis* sbsp. *lactis* Bb12 provient de notre laboratoire partenaire français: Institut Micalis (Microbiologie de l'alimentation au service de la santé humaine) UMR (Unité Mixte de Recherche) INRA-Paris-AgroTec., 78352 Jouy-en-Josas, France.

La souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, provient de la collection de notre laboratoire LMBAFS (Laboratoire de Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

#### **II.1.2. Les bactéries pathogènes**

Les bactéries pathogènes *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 nous ont aimablement été fournies par notre partenaire espagnol, le Pr Cintas, directeur du laboratoire de sécurité alimentaire par les bactéries lactiques et les probiotiques de l'université de Complutence, Madrid, Espagne.

### **II.2. Origine des gousses caroube**

La caroube utilisée dans ce travail a été récoltée en Juillet 2012 à Sidi Lakhdar (Mostaganem). Ces gousses sont débarrassées de leurs graines avant d'être ensuite laissées bien sécher à l'air libre, puis conservées à l'abri de la lumière et l'humidité jusqu'à leur broyage au moment de leur utilisation.

### **II.3. Choix des milieux de culture et conditions de croissance**

### II.3.1. Choix de milieu de culture

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15min. Les bifidobactéries sont cultivées sur bouillon MRS (De Man et al ; 1960) additionné de cystéine-HCL à 0,05% (P/V) pH 6.5, et dénombrées sur le même milieu gélosé. La mise en culture des bactéries pathogènes nécessite un milieu liquide BHI (Bouillon cœur de cervelle), utilisé comme milieu d'enrichissement. Le dénombrement est réalisé sur milieux solides, adéquats pour chaque souche. Le milieu de dilution utilisé est le milieu de Ringer que l'on répartit dans des tubes à essais (9 ou 10 mL par tube selon la dilution recherchée).

### II.3.2. Les conditions de croissance

#### II.3.2.1. Bactéries bénéfiques

Etant donné que les bifidobactéries ne tolèrent pas l'oxygène (anaérobie stricte) en raison de la formation de composés oxygénés toxiques comme le peroxyde d'hydrogène, l'ion superoxyde ou les radicaux hydroxylés, leur culture nécessite l'addition de cystéine chlorhydrique Cys-HCl à 0,05% au milieu (Scardovi, 1986). Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'utilisation de jarres d'anaérobiose. La souche *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS est une bactérie anaérobie facultative, elle est incubée à 37°C en anaérobiose sur milieu solide ou liquide.

#### II.3.2.2. Les bactéries pathogènes

- **Repiquage des espèces bactériennes:** les différentes souches ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
- **Préparation de l'inoculum :** des colonies bien séparées des souches concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 mL de bouillon nutritif puis incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.
- **Préparation des disques:** des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage) ou l'utilisation des

papiers disques stérile, sont chargés d'extrait de gousse de caroube. Des disques imprégnés d'eau sont également utilisés comme témoin négatif.

**-Préparation des milieux de culture :** la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm, répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à température ambiante avant leur emploi.

**- Ensemencement:** des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37°C.

## **II.4. Extraction des polyphénols de caroube**

### **II.4.1. Préparation et broyage des gousses**

Les gousses préalablement séchées à l'air libre sont débarrassées des graines et finement broyées (broyeur moulinex). La poudre de gousse de caroube est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### **II.4.2. Opération d'extraction**

Les polyphénols de caroube ont été extraits à partir de poudre de pulpe utilisée à 10% (P/V) par deux types de solvants: le mélange éthanol-eau (7v /3v) et l'eau distillée (Marston et Hostettmann, 2006).

L'extraction est réalisée par trois macérations successives dans chacun des solvants sous agitation pendant 24h suivies par une décantation de 24h pour éliminer les particules indésirables (boues, graisses et résines) (fig. 10).

La phase aqueuse obtenue est récupérée pour être filtrée et séchée par évaporation du solvant à 55°C avec un rotavapor (Buchi.).

## II.5. Détermination de la matière sèche

La teneur en matière sèche est déterminée par le séchage de l'échantillon à  $103 \pm 1$  jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigié *et al.*, 1983).

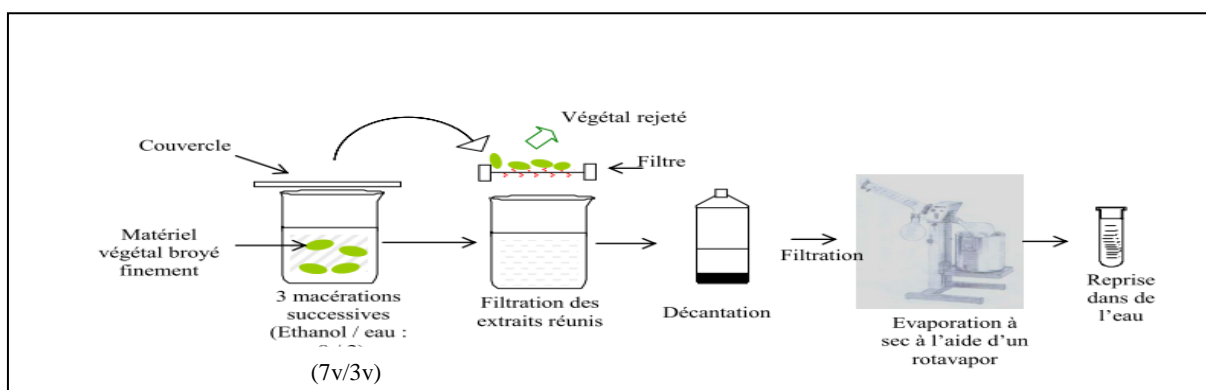
## II.6. Dosage des composés phénoliques

### II.6.1. Dosage par la méthode au réactif Folin-Ciocalteu

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique apporté par le réactif Folin-Ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène), par les polyphénols en milieu alcalin (Catalano *et al.*, 1999). Le dosage des polyphénols est effectué par la méthode de Singleton (1965, cité par Dogyan *et al.*, 2005).

Le résidu obtenu après l'extraction est dissout dans un 5 mL d'eau distillée, puis 100ul de cette solution mère est dilué jusqu'à 3mL. Ensuite ajouter 0.5mL de réactif de Folin-Ciocalteu et laisser réagir pendant 3 min avant d'ajouter 2 mL de carbonate de sodium à 20%. On agite bien (vortex) le mélange et le laisser incuber à l'obscurité pendant 1h avant de lire l'absorbance à 760 nm.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la droite d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique (0 à 5mg/mL par paliers de 1mg), et exprimée en milligrammes équivalents de d'acide gallique par g de pulpe de caroube.



**Figure 10:** Méthode d'extraction de caroube (Marston et Hostettmann, 2006)

## **II.7. Dosage des flavonoïdes.**

Le dosage des flavonoïdes est déterminé par la méthode de [Woisky et Salatino \(1998\)](#) qui consiste à mélanger 2 mL d'extrait phénolique de pulpe de caroube avec 2 mL d'une solution d'ALCl<sub>3</sub> à 2% (P/V) qu'on laisse incuber pendant 30 min avant de lire l'absorbance de la couleur jaune à 430 nm.

La droite étalon est réalisée avec différentes concentrations de quercétine qui subissent le même mode opératoire que les échantillons.

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont obtenus par extrapolation en utilisant la droite étalon.

## **II.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).**

Généralement la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration de substance antimicrobienne capable d'inhiber la croissance visible d'un microorganisme donné après un temps d'incubation de 18 à 24h ([Teresa et al., 1998](#)).

La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu solide telle que décrite par [Chabert et Daguët \(1985\)](#).

Dans un tube à essai, on ajoute des volumes variables d'extraits phénoliques de caroube de façon à ce que le gradient de sa concentration suive une progression à raison 0.25 mg/mL entre 0 et 5 mg/mL. Ces tubes, contenant des solutions limpides sont incubés à 37°C pendant 24h afin de contrôler la stérilité des préparations.

Ensuite, chaque tube de l'une de séries estensemencé avec 1mL d'un inoculum de 10<sup>8</sup> UFC /mL. On incube ensuite tous les tubes à l'étuve à 37°C pendant 24 h. Ensuite, 0.1mL du contenu de chaque tube estensemencé dans un milieu solide et incubé à 37°C pendant 24h à l'issue desquelles la plus faible concentration qui a totalement inhibée le germe étudié est considère comme la CMI.

## **II.9. Mise en évidence le pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux de caroube**

### **II.9.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé**

Cette expérience vise à cultiver les bactéries dans des boîtes de pétri ensemencées avec  $10^8$ UFC/mL. Après un repos de 15 min, des disques filters contenant différentes concentrations d'extraits de caroube (0, 10, 20,50 mg/mL) ont été déposés sur la gélose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h en aérobiose.

Les diamètres des zones d'inhibition développées ont été mesurés à l'aide d'une règle. Cette méthode consiste à cultiver les souches pathogènes et bénéfiques en présence de différentes concentrations d'extrait de caroube, et l'incubation se fait à 37°C à des intervalles de 2h. Le nombre de bactéries initial est ajusté à  $1.10^8$  log UFC /mL.

A chacun des temps précités, on prélève les cultures correspondantes, et on effectue des dilutions décimales, on étale 100ul de chacune d'elle sur une boîte de milieu spécifique. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h en anaérobiose pour la souche *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 et en aérobiose pour la souche lactique LbRE-LSAS. Les souches pathogènes ont été incubées à 37C° pendant 24h en aérobiose.

### **II.10. Traitement statistique des résultats**

Toutes les mesures ont été effectuées trois fois en triple et les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique des résultats (ANOVA) a été réalisée par le logiciel Statbox (V.6.40 copyright Grimmer logiciels 1997-2002 Paris). La différence des moyennes est considérée significative à  $P<0.05$ .

# **Chapitre III**

## ***Résultats et discussions***

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

### **III.1. Teneurs en composés polyphénoliques de la pulpe de caroube**

#### **III.1.1. Les polyphénols totaux**

La poudre de pulpe de caroube analysée dans ce travail contient 67% (P/P) de matière sèche versus 93.1% dans celle analysée par [Turhan et al. \(2006\)](#). En revanche, les gousses vertes renferment moins de matière sèche (14.79 %) et plus de polyphénols lorsque l'eau est utilisée comme solvant d'extraction ([Abi Azar, 2007](#)).

Nos résultats indiquent que le rendement de l'extraction des polyphénols totaux à l'eau est de 32.2 mg/g MS; alors que celui obtenu par le mélange éthanol-eau (7v/3v) n'est que de 23.8 (mg/g MS). Ce rendement d'extraction des polyphénols semble dépendre de la polarité du solvant (l'eau étant plus polaire que l'éthanol).

[Rakib et al. \(2010\)](#) ont rapporté des rendements d'extraction à chaud de polyphénols totaux variables de 3.28 à 55.73 mg/g de matière sèche en utilisant l'éthanol pur comme solvant dans 6 variétés de farine de caroube de différentes régions du Maroc.

[Makris et Kefalas \(2004\)](#) ont testé plusieurs solvants d'extraction de polyphénols totaux de gousses de caroube qui ont donné des rendements en mg/g MS différents : acétate d'éthyle (0.19), méthanol (2.20 mg/g), méthanol 80 % (V/V) (3.38 mg/g), l'acétone 80% (V/V) (9.28 mg/g) et l'acétonitrile (3.22 mg/g).

La jeune écorce de caroubier est plus de dix fois plus riche en polyphénols extractibles au méthanol. En effet, [Custodio et al. \(2013\)](#) ont rapporté que le rendement de l'extraction des polyphénols totaux de jeune écorce du caroubier au méthanol (23.8 mg/g MS) est supérieur à celui obtenu à l'eau bouillie (4.8 mg/g MS).

[Sebai et al. \(2013\)](#) ont comparé l'effet du solvant sur le rendement d'extraction des polyphénols totaux (exprimé en mg/g MS) à partir de la pulpe et de la graine de caroube, respectivement, et ont rapporté les résultats suivants : l'eau (22.27 pour la pulpe et 13.16 pour la graine), l'éthanol (8.36 vs 6.79), le méthanol (1.27 vs 2.41), l'éther de pétrole (0.27 vs 0.48) et l'acétone (2.58 vs 4.66).

- Plus anciennement, [Joslyn et al. \(1968\)](#) avaient déjà constaté qu'à l'issue d'extractions de polyphénols totaux à chaud au mélange méthanol-eau (V/V), les gousses vertes contenaient beaucoup plus (204.3mg/g MS) de polyphénols que les gousses mûres (67mg/g MS).

### III.1.2 Les flavonoïdes

Les résultats obtenus indiquent que les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de caroube sont de l'ordre de 1.70 et 3.37 mg/g MS, respectivement.

Makris et Kefalas (2004) ont observé que le rendement d'extraction des flavonoïdes de gousses de caroube dépendait de la nature du solvant. Ils avaient testé quatre solvants d'extraction (acétate d'éthyle, méthanol pur, mélange méthanol-eau (8V/2V) et le mélange acétone-eau (8V/2V) et obtenu des rendements en flavonoïdes variables de 0.27 à 1 mg/g MS.

Custodio et al. (2013) ont rapporté que les teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques étaient de l'ordre de 0.5 mg/g MS; alors que celles des extraits aqueux à chaud étaient à l'état de traces.

En revanche, Sebai et al. (2013) confirment les observations de Makris et Kefalas (2004) qui lient le rendement d'extraction à la nature du solvant, et préconisent une plage de variation de ce rendement allant de 0.12 à 6.78 mg /g MS.

Les rendements obtenus dans ce travail sont légèrement inférieurs à ceux trouvés par Rakib et al. (2010) qui ont rapporté des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de 5.92 et 5.54 mg/g MS de poudre de gousse mûre de caroube des régions marocaines d'Essaouira et de Taza, respectivement.

Certains auteurs (Ebrahimi et al., 2008; Lee et al., 2003) attribuent ces différences dans les teneurs en flavonoïdes de la gousse de caroube à plusieurs facteurs comme le climat et l'environnement (zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies..., etc.), le patrimoine génétique, la période de récolte et le stade de développement, ainsi que la méthode d'extraction et de quantification de ces substances.

## III.2. Activité antibactérienne des extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube.

### III.2.1. Concentration minimale inhibitrice des souches (CMI).

La CMI, pour une souche pathogène donnée, représente la plus faible concentration d'extrait phénolique de caroube qui inhibe toute croissance visible après 24h d'incubation. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis d'un inhibiteur donné (Kablan, 2008).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/mL d'extrait phénolique aqueux de caroube) des différentes souches pathogènes testées dans ce travail sont variables, selon la souche, de 0.85 à 3.10 mg/mL.

Le classement des souches selon un ordre décroissant de leur sensibilité (exprimée d'une part par la CMI et d'autre part par le diamètre ( $\Theta$ ) des zones d'inhibition obtenu avec 50 mg d'extrait de polyphénols et exprimé en mm) vis-à-vis de l'extrait phénolique aqueux de caroube est comme suit : *E. coli* ATCC25922 (CMI= 0.85 et  $\Theta$ =17mm), *Escherichia coli* ATCC 8739 (CMI= 0.98 et  $\Theta$ =15mm), *Bacillus cereus* ATCC14579 (CMI= 1.5 et  $\Theta$ = 14mm), *Staphylococcus aureus* ATCC33862 (CMI=2 et  $\Theta$ =13mm), *S aureus* ATCC25923 (CMI=2.50 et  $\Theta$ =12mm), *Shigella sonnei* ATCC p4001 (CMI= 2.75 et  $\Theta$ =12mm), et *B. cereus* ATCC11778 (CMI= 2.90 et  $\Theta$ = 10mm) (fig. 11 et 12).

C'est la souche *E. coli* ATCC25922 qui s'est révélé la plus sensible (17mm) vis-à-vis des extraits phénoliques aqueux de caroube suivie de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001 et de *Bacillus cereus* ATCC11778, dont les zones d'inhibitions varient de 10 à 15mm en présence de 50mg de polyphénols/mL d'extrait.

Des concentrations d'extraits phénoliques de gousses de caroube de 20mg/mL retardent la croissance des bactéries pathogènes; tandis que la plus forte concentration (50mg /mL) inhibe totalement la croissance de *Staphylococcus aureus* ATTC25923, *Bacillus cereus* ATTC11778 et *Escherichia coli* ATTC25922, respectivement après 12, 10 et 8h d'incubation.

Cette observation va dans le même sens que celle rapportée par les travaux de [Ben hsouna et al. \(2012\)](#) qui ont constaté une plus grande sensibilité (exprimée par la CMI en mg/mL et le diamètre des zones d'inhibition en mm) de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (0.31 et 20), *Staphylococcus aureus* ATCC 6536 (0.31 et 22), *Micrococcus luteus* ATCC1880 (0.60 et 19), *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228 (1.25 mg/mL et 17mm).

Ces mêmes auteurs avaient également rapporté que les CMI de ces extraits méthanoliques de polyphénols de caroube vis-à-vis de souches pathogènes à gram négative comme *Salmonella*

*enteridis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* étaient, respectivement, de l'ordre 2.5, 1.25, 2.25, 1.25 mg/mL.

Par ailleurs, [Catalina et al. \(2009\)](#) ont exploré l'effet d'extrait méthanolique de romarin sur *Staphylococcus aureus* et, ont trouvé une CMI très élevée par rapport à ce qui a été rapporté par la littérature jusqu'à présent, équivalente à 50mg/mL d'extrait. Ceci pourrait être lié à la variété de

leur souche qui peut être très résistante ou bien à une faible concentration en composés inhibiteurs de leurs extraits. Les CMI trouvées dans ce travail pour les deux espèces appartenant à ce genre ne dépassent pas les 2.5mg/mL d'extrait.

Les résultats reportés dans la figure 11 montrent que l'extrait phénolique de gousses de caroube de concentration supérieure à 10mg/mL inhibe toutes les souches pathogènes utilisées en un temps d'incubation n'atteignant pas 10h, exceptée *Pseudomonas aeruginosa*; mais n'inhibe pas les deux souches bénéfiques testées, *Lactobacillus rhamnosus* (LbRE-LSAS) et *Bifidobacterium animalis* Subsp. *lactis* (Bb12).

Les diamètres des zones d'inhibition provoqués par les extraits phénoliques de gousses de caroube de concentrations 20 et 50 mg/mL sont plus élevés que celui obtenu avec 10mg/mL. Ces observations laissent penser à un effet dose-dépendant des polyphénols sur les germes pathogènes.

L'activité des polyphénols serait quelque part dépendante de leur degré d'oxydation. En effet, les polyphénols sont des composés très susceptibles à l'auto-oxydation en présence de l'oxygène de l'air. Cette oxydation se traduit par une polymérisation des monomères tels que les monomères de flavonoïdes pour donner des polymères de poids moléculaire élevé.

Il a été démontré que le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes se fait, soit par la privation des ions métalliques tel que le fer, soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement de ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines) ou avec les enzymes ([Scalbert, 1991](#); [Cowan, 1999](#)).

Cependant, l'activité antimicrobienne des polyphénols dépend également de leur degré de polymérisation; les monomères sont trop petits pour établir assez de ponts hydrogènes tandis que les polymères de haut poids moléculaire sont trop grands pour traverser la paroi bactérienne, le poids moléculaire idéal serait donc celui des oligomères ([Field et Lettinga, 1992](#)).

Cette analyse démontre également que la zone d'inhibition ne semble pas être la même selon la souche bactérienne considérée au seuil de signification de 5%. De plus, elle montre que la zone d'inhibition varie d'une bactérie à une autre.

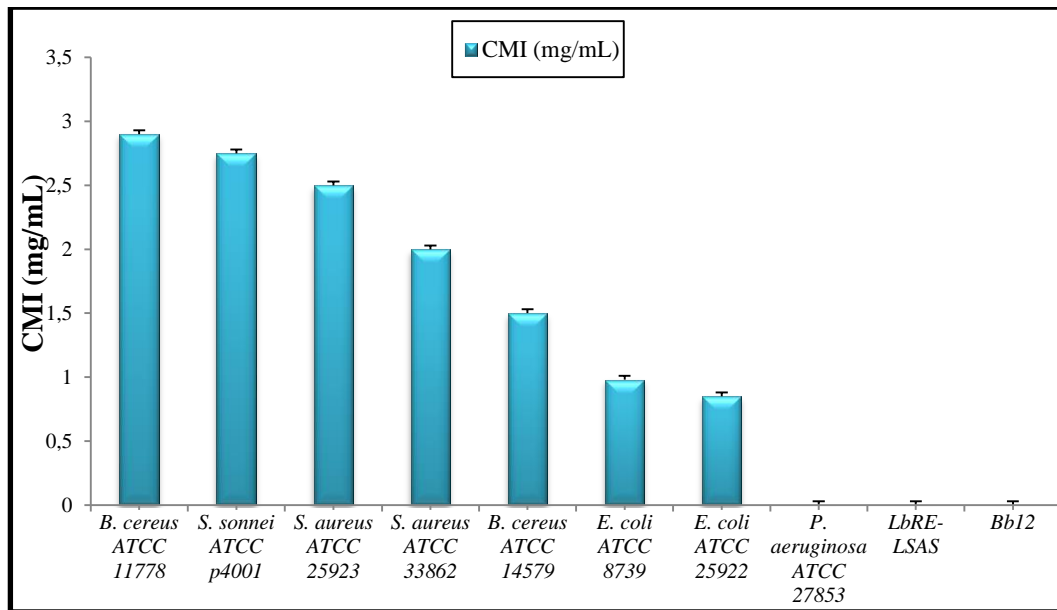
Haidar et Al-Taie (2009) ont testé *in vivo* l'effet de l'extrait aqueux de polyphénols de poudre entière de gousses de caroube, *Ceratonia siliqua*, sur la viabilité de *Candida albicans*. Selon leurs résultats, la concentration de 10mg/mL présente le meilleur pouvoir d'inhibition de la candidose.

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables (Scalbert et Williamson ; 2000). En effet, certaines quinones auraient un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas sur les bactéries à Gram négatif (Riffel et al., 2002). Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes (Bruneton, 1999).

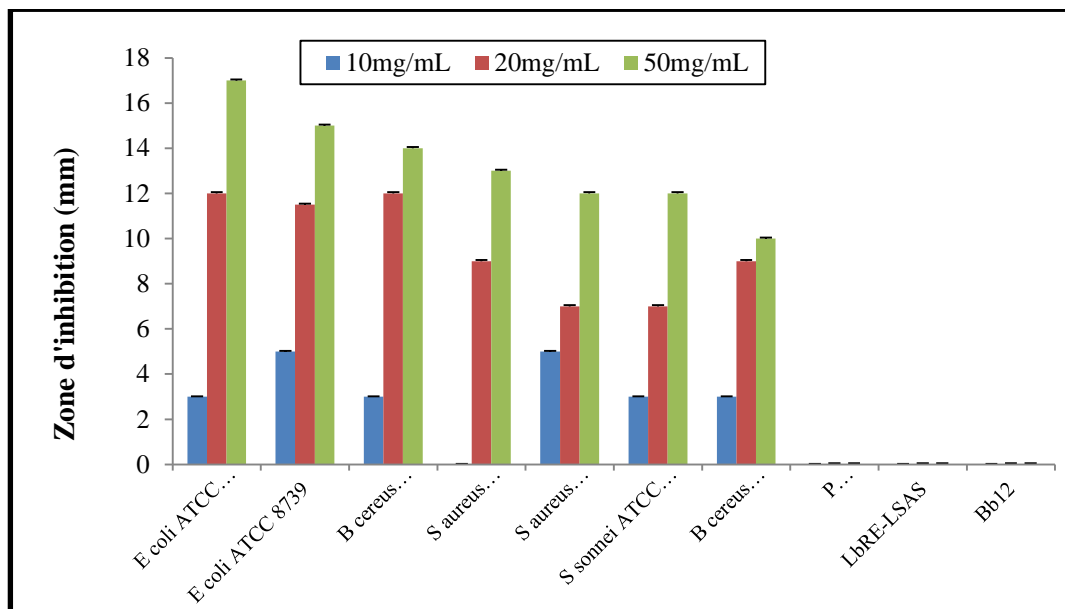
Les flavonoïdes, avec leurs différentes classes dont les plus importantes sont : les flavones, flavanols, flavonones, flavonones 3-ol, flavanes-3,4 diol, et les anthocyanidines (Marfak, 2003) ont un grand potentiel antibactérien (Alan et Miller, 1996) qui se manifeste:

- en se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne (Rojas et al., 1992; Perret et al., 1995).
- en perturbant leur métabolisme énergétique (Jones et al., 1994).

Par ailleurs, les tanins sont largement connus pour leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant (Nguz et al., 1996). Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Cowan, 1999).



**Figure 11** : Concentration minimale (mg de polyphénols/mL d'extrait aqueux) inhibitrice (CMI) des souches pathogènes et réaction des souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure12** : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes cultivées en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube après 24h de culture sur milieu solide à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

### III.3. Effets des extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube sur la

#### cinétique de croissance des souches pathogènes et des souches bénéfiques.

##### III.3.1. Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

L'action inhibitrice des extraits phénoliques aqueux de caroube sur *Escherichia coli* ATCC 25922 s'est manifestée après les deux premières heures de culture en présence de 20 et 50 mg/mL d'extrait où il y a une légère diminution de la biomasse initiale.

Cette inhibition s'accroît davantage pour piquer vers une viabilité nulle de *E. coli* après la sixième et la douzième heure d'incubation en présence de 20 et 50mg/mL, respectivement (fig.13). L'écart de viabilité entre le témoin (absence de polyphénols) et les échantillons (présence de polyphénols) varie environ de 3 à 4 log UFC/mL.

Au cours des deux premières heures d'incubation, une légère croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 de l'ordre 8.12, 5 et 3.87% a été enregistrée en présence de 10 et 20 et 50 mg/mL d'extrait phénoliques de caroube, et qui correspond à une vitesse de croissance de 0.32, 0.20 et 0.15 log UFC/h (fig. 14A) (tableau 2).

Après 4h de culture, la croissance d'*E. coli* ATCC 25922 diminue de 6.49 % en présence de 50 mg/mL. Cette croissance s'est déroulée à une vitesse d'inhibition de 0.27 log UFC/h (fig.14B) ; alors qu'en présence de 10 et 20 mg de polyphénols /mL, on enregistre une inhibition chiffrée à des pertes en cellules viables respectives de l'ordre de 0.57 et 1.9% seulement (tableau 2).

Une réduction de biomasse de l'ordre 0.58, 7.88 et 12.09% a été observée après 6h de culture d'*E. coli* ATCC 25922 en présence de 10, 20 50 mg/mL, respectivement (fig. 15A, tableau 2). Ceci correspond à une réduction de la vitesse de croissance de cette souche de l'ordre de 0.025, 0.37 et 0.47 log UFC/mL calculée pour les trois différentes concentrations de polyphénols testées.

Après 8h de culture, *E. coli* ATCC 25922 se trouve totalement inhibée en présence de 50mg de polyphénols /mL d'extrait de gousses de caroube; alors qu'en présence de 10 et 20 mg de polyphénols/mL, une perte de viabilité de l'ordre de 0.7 et 3.6% a été enregistrée (Fig.15B, tableau 3).

Lorsque cette souche est exposée pendant 10h aux concentrations de polyphénols de 10 et 20mg/mL, son inhibition se poursuit et il y a, respectivement, perte de 1.88 et 3.68% de sa

viabilité, soit 0.16 et 0.27 log UFC/mL (fig. 16A).

La viabilité d'*Escherichia coli* ATCC 25922 exprimée en log UFC/mL continue de diminuer et affiche des pertes de 0.13 (soit 1.88%) et 0.52 log (soit 6.95%) lorsqu'elle est cultivée pendant 12h respectivement avec 10 et 20 mg/mL d'extrait phénoliques de caroube (fig. 16B).

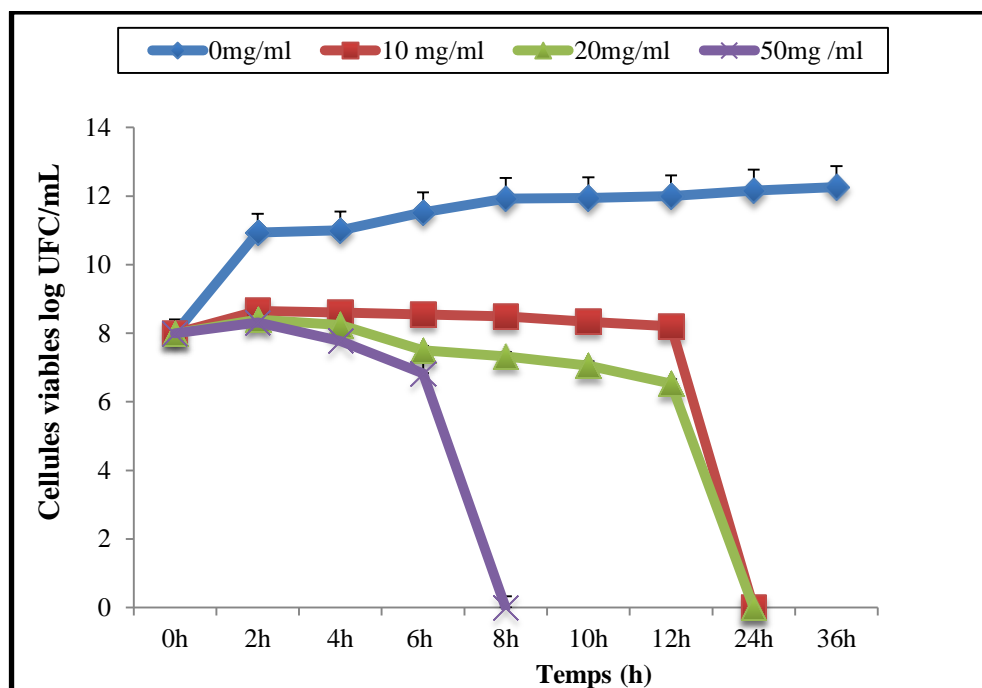
L'inhibition totale d'*Escherichia coli* ATCC 25922 n'a été obtenue qu'après 24h de culture.

Biyiti et al. (2004) ont testé l'activité antibactérienne in vitro des extraits hydro-éthanoliques de *Cissus petiolata*, *Harrissonia abyssinica*, *Maesopsis eminii* et *Pyrenacantha staudtii* contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont constaté que les quatre plantes se sont révélées actives sur une ou plusieurs bactéries. L'extrait de *P. staudtii* a été le plus actif en induisant des diamètres d'inhibition de croissance de 11, 14.6 et 15 mm sur *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement.

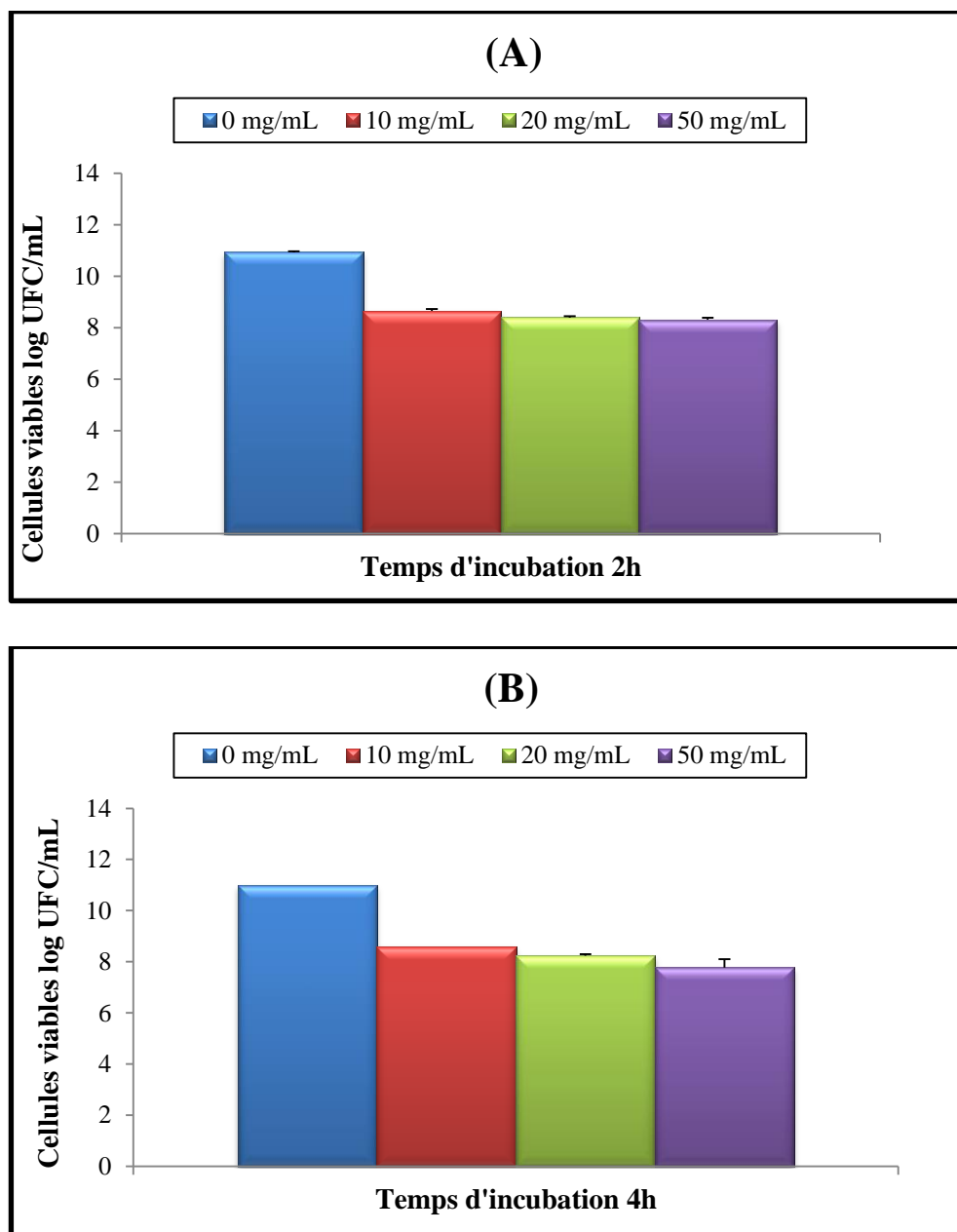
Ben hsouna et al. (2012) ont observé que les extraits méthanoliques de polyphénols de gosses de caroube induisaient des zones d'inhibition de diamètre compris entre 10 et 22 mm dans le cas d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteridis* et *Staphylococcus aureus* ATCC 6536. Ils ont constaté que toutes ces souches, excepté *Staphylococcus aureus* ATCC 6536, étaient plus sensibles aux extraits phénoliques de gousses de caroube qu'à la gentamicine.

Molina-Torres et al. (1999) ont testé l'effet antimicrobien des alkamides sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus subtilis* et *saccharomyces cerevisiae*. Leurs résultats indiquent que *E coli* a été inhibée à 90% après 8h d'incubation en présence de 25 mg/mL d'affinine (un alkamide); alors que de 200, voire 300 mg/mL de capsaïcine retardent seulement sa croissance. *P. solanacearum* était plus résistante par rapport à *E coli* et n'a été totalement inhibée qu'après l'administration de 150 mg/mL d'affinine, et a été retardée juste de 20 % en présence de 300 mg/mL de capsaïcine.

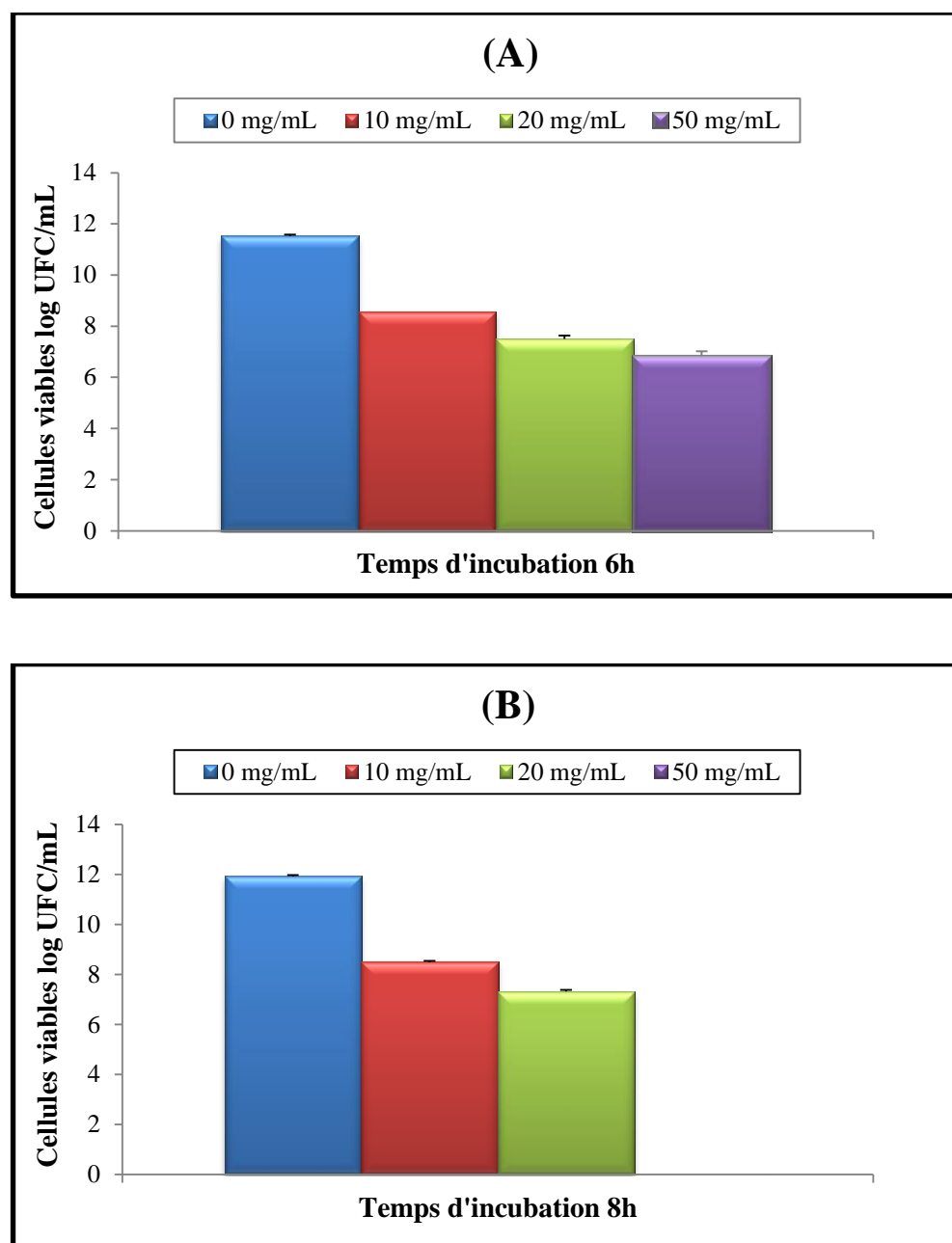
La capsaïcine avait un grand pouvoir inhibiteur contre *Bacillus subtilis* par rapport à l'affinine en inhibant cette souche à une concentration de 25mg/mL, tandis que l'affinine le faisait à 150mg/mL.



**Figure 13:** Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

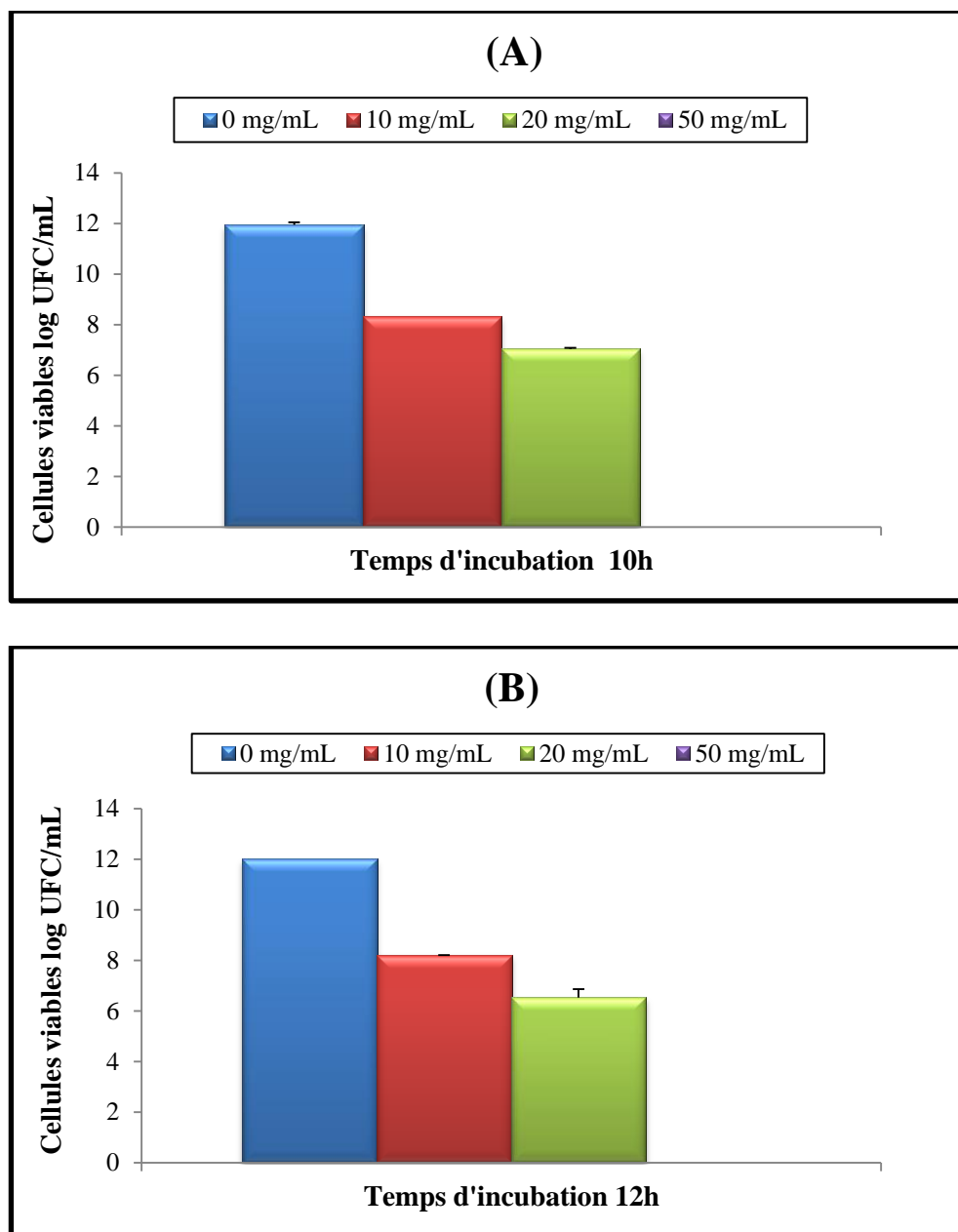


**Figure 14:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 15:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC25922 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 6h (A) et 8h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 16:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 2:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+8.12 $\pm$ 0.75	+5 $\pm$ 0.09	+3.87 $\pm$ 0.07
<b>2h-4h</b>	-0.57 $\pm$ 0.12	-1.9 $\pm$ 0.08	-6.49 $\pm$ 0.95
<b>4h-6h</b>	-0.58 $\pm$ 0.17	-7.88 $\pm$ 0.65	-12.09 $\pm$ 1.28
<b>6h-8</b>	-0.70 $\pm$ 0.16	-3.60 $\pm$ 0.95	-85.35 $\pm$ 00
<b>8h-10h</b>	-1.88 $\pm$ 0.24	- 3.68 $\pm$ 0.62	-
<b>10h-12h</b>	-1.88 $\pm$ 0.28	- 6.95 $\pm$ 0.51	-
<b>12h-24h</b>	-100 $\pm$ 0.36	-100 $\pm$ 1.98	-
<b>24h-36h</b>	00 $\pm$ 00	-	-

**Tableau 3:** Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.32 $\pm$ 0.05	+0.2 $\pm$ 0.04	+0.15 $\pm$ 0.03
<b>2h-4h</b>	-0.02 $\pm$ 0.005	-0.08 $\pm$ 0.005	-0.27 $\pm$ 0.05
<b>4h-6h</b>	-0.025 $\pm$ 0.007	-0.37 $\pm$ 0.002	-0.47 $\pm$ 0.01
<b>6h-8</b>	-0.03 $\pm$ 0.006	-0.09 $\pm$ 0.001	-3.41 $\pm$ 0.08
<b>8h-10h</b>	-0.08 $\pm$ 0.007	-0.13 $\pm$ 0.0003	-
<b>10h-12h</b>	-0.06 $\pm$ 0.002	-0.26 $\pm$ 0.004	-
<b>12h-24h</b>	-4.1 $\pm$ 0.36	-3.26 $\pm$ 0.07	-
<b>24h-36h</b>	00 $\pm$ 00	-	-

### III.3.2. Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 8739

La cinétique de croissance d'*E. coli* ATCC 8739 en présence de différentes concentrations de polyphénols de gousses de caroube est illustrée par la figure 17. L'action inhibitrice d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube vis-à-vis la souche *Escherichia coli* ATCC 8739 a été observée depuis les premières heures de sa culture en présence de 20 et 50 mg de polyphénols/mL d'extrait, et s'est traduite, respectivement, par une perte de viabilité de l'ordre 1.37 et 10.25% (tableau 4, figure 18A).

En revanche, à la concentration de 10mg de polyphénols/mL, la croissance de cette souche n'est pas affectée; puisqu'elle enregistre même une légère augmentation de la biomasse en affichant 0.25% (tableau 4) de plus, soit 0.02 log UFC/mL (figure 18A), en matière de viabilité de (fig. 18A).

Après 4h de culture d'*E. coli* ATCC 8739, une légère hausse de la biomasse (+ 6.12%) est toujours enregistrée en présence de 10 mg/mL (tableau 4), et correspondant à un léger taux d'augmentation de la vitesse de croissance de l'ordre de + 0.44 log UFC /h (tableau 5). L'effet des polyphénols de gousses de caroube commence à se faire sentir chez cette souche quand elle est exposée aux concentrations de 20 et 50 mg/mL où elle enregistre au cours de cet intervalle de culture 2-4h des taux de pertes de viabilité respectifs équivalents à 7.12 et 14.37% (tableau 4) (figure 18B).

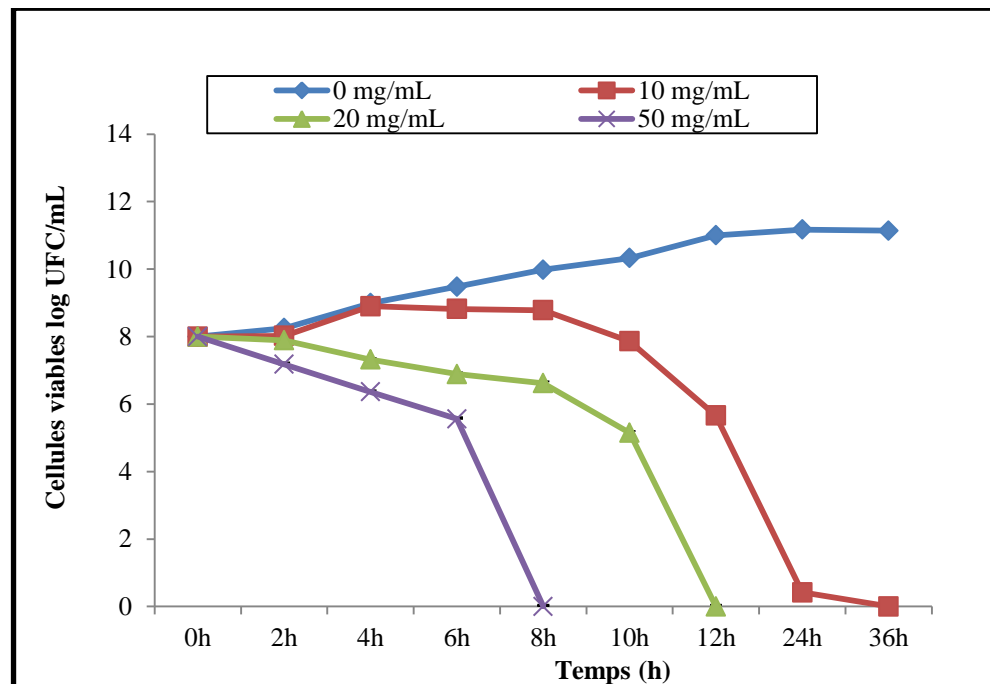
Lorsque la culture est prolongée à 6h, les concentrations de 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de caroube retardent encore plus la croissance d'*E. coli* ATCC 8739 dont la biomasse perdue est respectivement de l'ordre 5.75 et 10.01% (tableau 4) (Fig. 19A)

La poursuite de cette culture à 8h, permet d'enregistrer des taux de pertes de viabilité de l'ordre de 0.62, 3.37 et 65.37% en présence de 10, 20 et 50 mg de polyphénols/mL d'extrait (fig. 19B, tableau 4), et qui correspondent à des pertes de vitesse de croissance de 0.02, 0.16 et 2.61 log UFC/h respectivement (fig.19B, tableau 5).

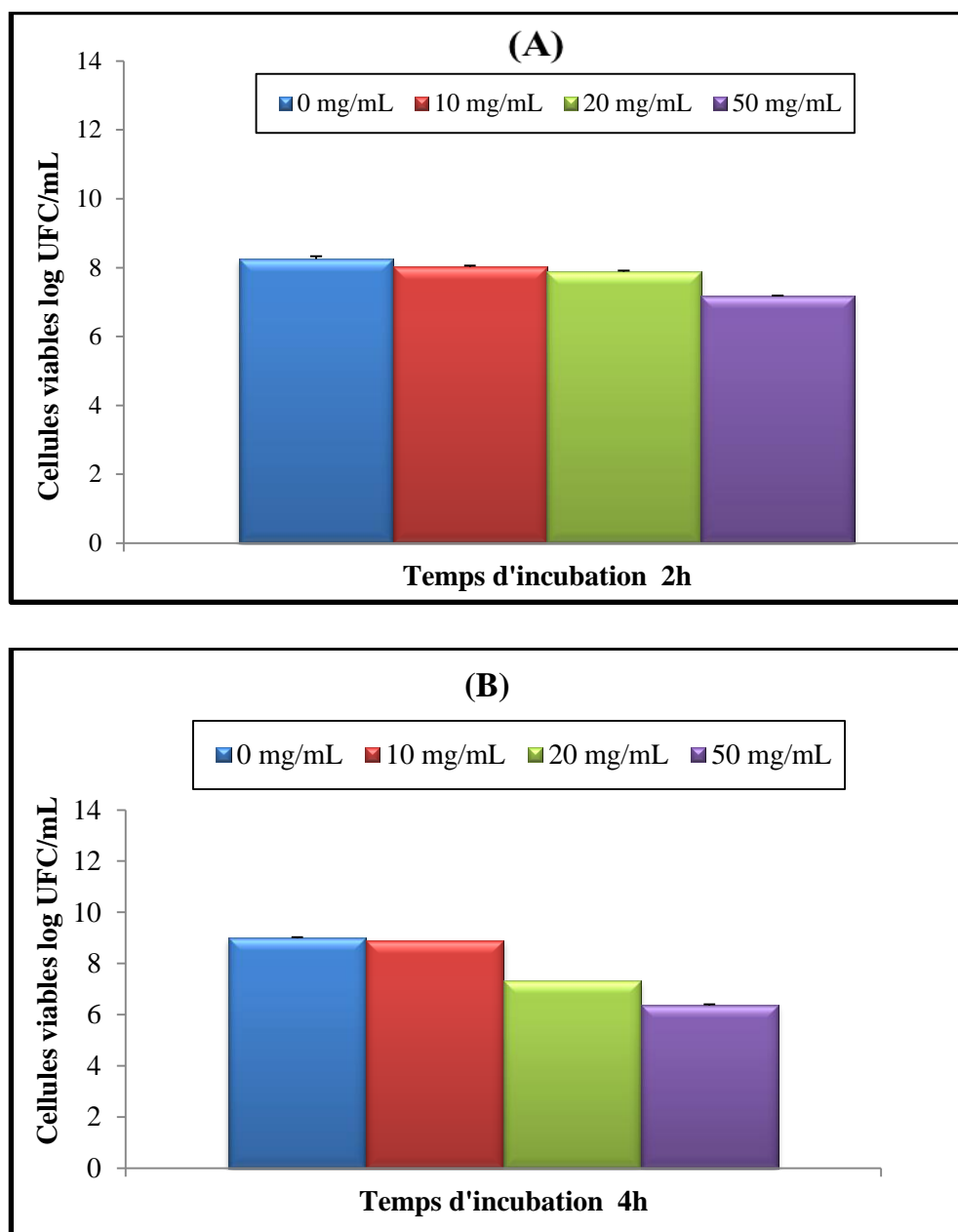
Entre la huitième et la dixième heure de culture en présence des trois concentrations de polyphénols, le nombre de cellules viables continue sa régression à des taux de 0.03, 0.3 et 0.04% sous l'effet de 10, 20 et 50 mg de polyphénols/mL d'extrait, respectivement (tableau 4, fig.20A).

*Escherichia coli* ATCC 8739 se trouve totalement (100%) inhibée au bout de 12h de culture en présence de 50 mg de polyphénols/mL d'extrait de gousses de caroube; tandis qu'elle perd presque 65% de sa viabilité en présence de 20 mg/mL d'extrait. Cette perte est moindre (environ 28%) sous l'effet de 10 mg/mL (tableau 4, fig.20B).

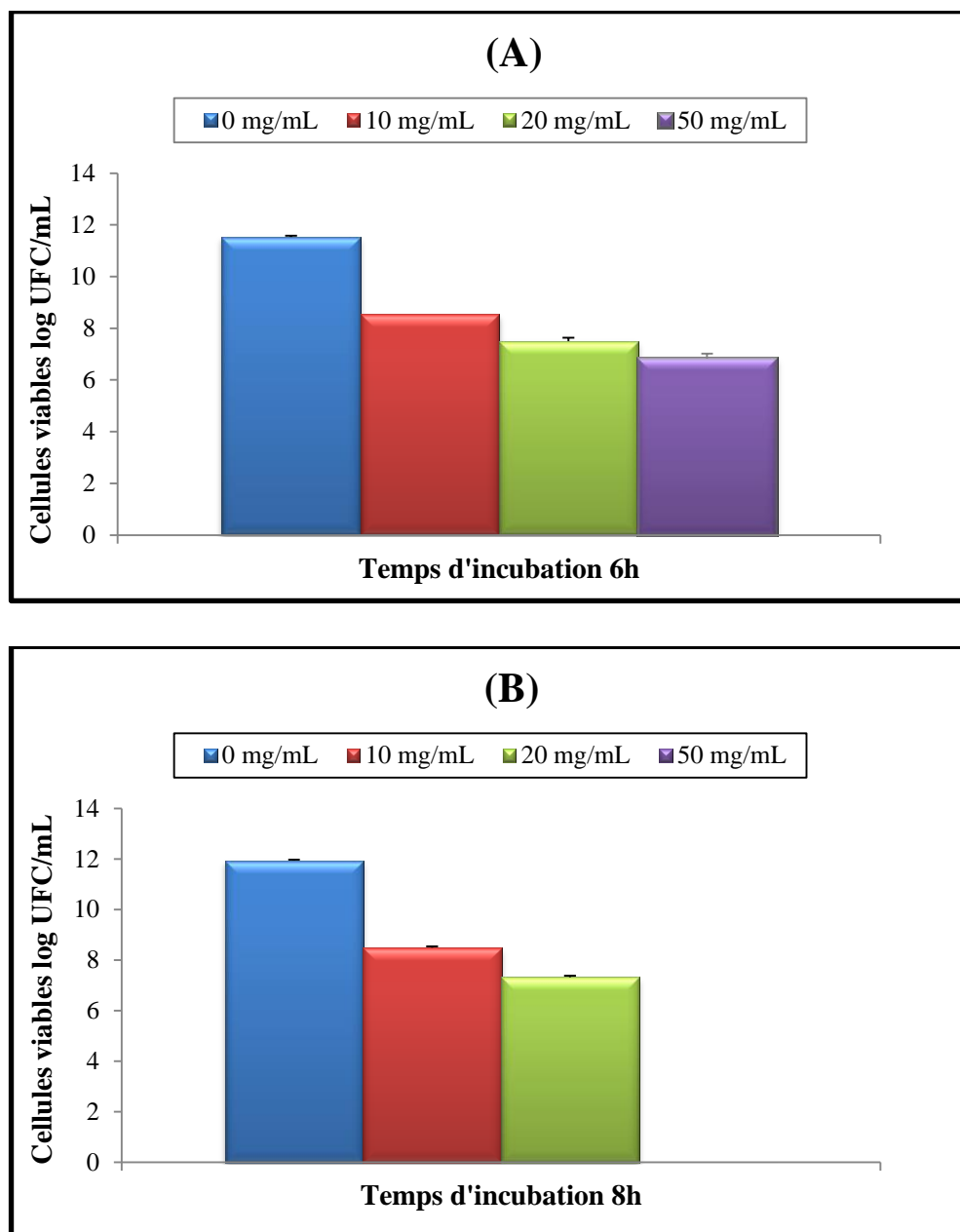
Dans l'intervalle 12-24h, il ne reste plus de cellules viables dans les cultures d'*E. coli* ATCC 8739 exposées à 20 mg de polyphénols/mL d'extrait et presque pas dans celles exposées à 10 mg/mL (fig.17, tableau 4).



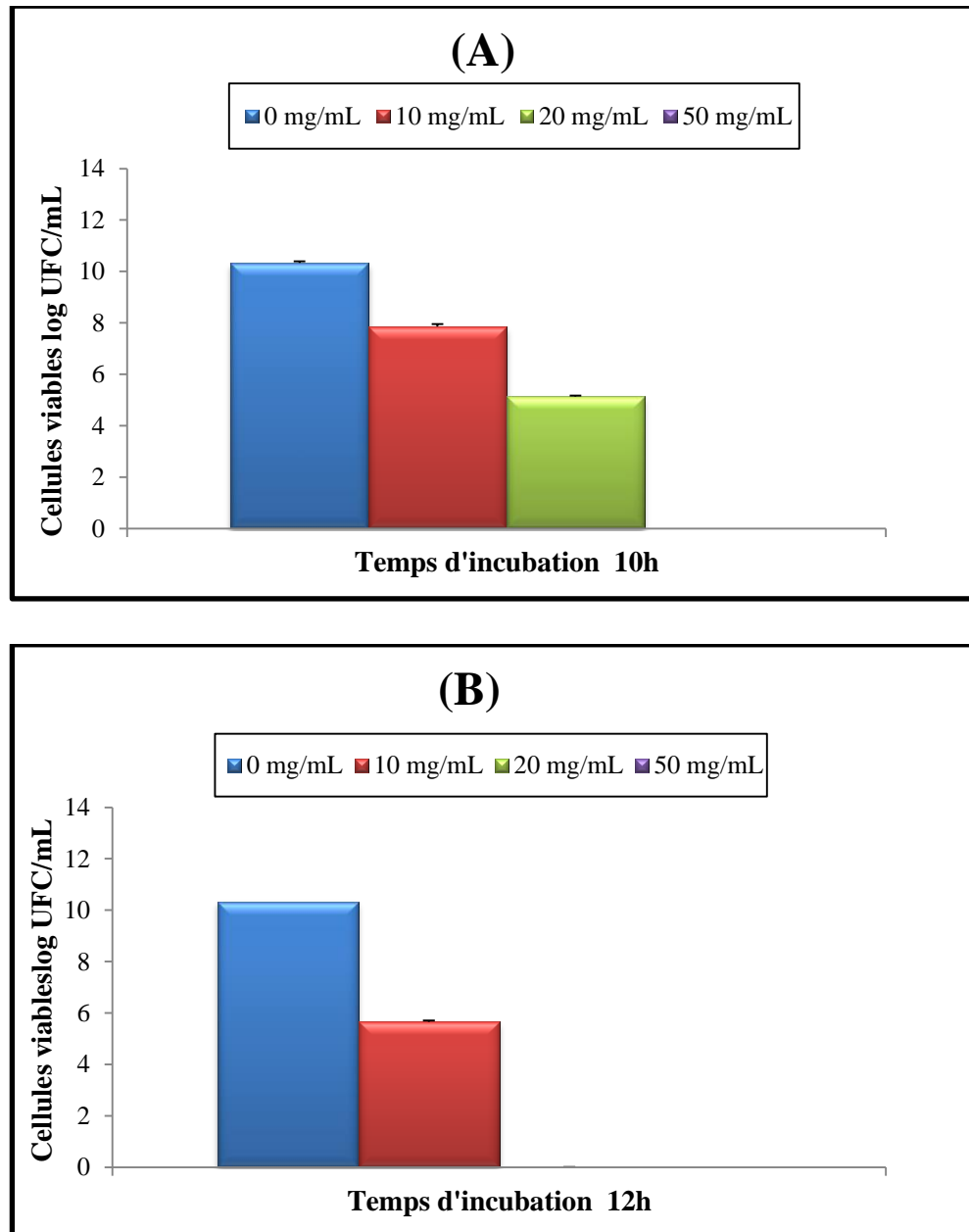
**Figure 17:** Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 8739 en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.



**Figure 18:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence (10, 20 et 50mg/mL) d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.



**Figure 19:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait Phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 6h (A) et 8h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.



**Figure 20:** Viabilité des cellules d'*Escherichia coli* ATCC 8739 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 10h (A) et 12h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.

**Tableau 4 :** Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité d'*Escherichia coli* ATCC 8739 en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.

cinétique	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.25 $\pm$ 0.03	-1.37 $\pm$ 0.17	-10.25 $\pm$ 0.19
<b>2h-4h</b>	+6.12 $\pm$ 0.12	-7.12 $\pm$ 1.13	-14.37 $\pm$ 0.12
<b>4h-6h</b>	-1.12 $\pm$ 0.07	-5.75 $\pm$ 0.97	-10.01 $\pm$ 0.70
<b>6h-8</b>	-0.62 $\pm$ 0.02	-3.37 $\pm$ 0.22	-65.37 $\pm$ 1.20
<b>8h-10h</b>	-0.03 $\pm$ 0.005	-0.3 $\pm$ 0.01	00
<b>10h-12h</b>	-27.62 $\pm$ 0.20	-64.37 $\pm$ 1.80	00
<b>12h-24h</b>	-65.5 $\pm$ 0.30	00	00
<b>24h-36h</b>	00 $\pm$ 00	00	00

**Tableau 5:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Escherichia coli* ATCC 8739 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.

Vitesse	10 mg/mL	20 mg/mL	50 mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.01 $\pm$ 0.004	-0.05 $\pm$ 0.003	-0.41 $\pm$ 0.012
<b>2h-4h</b>	+0.44 $\pm$ 0.03	-0.28 $\pm$ 0.036	-0.41 $\pm$ 0.011
<b>4h-6h</b>	-0.04 $\pm$ 0.001	-0.23 $\pm$ 0.03	-0.40 $\pm$ 0.02
<b>6h-8</b>	-0.02 $\pm$ 0.003	-0.16 $\pm$ 0.02	-2.61 $\pm$ 0.21
<b>8h-10h</b>	-0.46 $\pm$ 0.08	-0.73 $\pm$ 0.03	-
<b>10h-12h</b>	-1.10 $\pm$ 0.14	-2.57 $\pm$ 0.04	-
<b>12h-24h</b>	-2.62 $\pm$ 0.09	00	-
<b>24h-36h</b>	00 $\pm$ 00	00	-

Naili *et al.* (2010), ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*. Ils ont utilisé plusieurs souches dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries étudiées.

Jimenez *et al.* (2011) ont comparé l'activité antimicrobienne de différents extraits obtenus à chaud et à froid (méthanolique, éthanolique, à l'acétate d'éthyle, chloroformique, au benzène et aqueux) de *Prunus serotina* subsp *capuli* et de tester la potentialité de différents extraits de solvants (éthanol, méthanol, acétate d'éthyle, le chloroforme, le benzène, l'extrait aqueux chaud et froid) contre différentes souches bactériennes telles que *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Salmonella typhi* ATCC 25241 et *Salmonella paratyphi* ATCC 9150.

Ces auteurs ont observé que ce sont les extraits éthanolique et méthanolique obtenus à chaud qui avaient manifesté le plus d'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées au vu des diamètres de zones d'inhibition observés et qui variaient de 12 à 21 mm selon la souche. Les mêmes extraits, mais obtenus à froid, généraient des zones d'inhibition de diamètre plus faible compris entre 7 et 9 mm. Ces observations laissent penser que l'extraction à chaud permettrait l'obtention de plus de principes actifs antimicrobiens.

### III.3.3. Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC14579

La cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en absence et en présence de différents extraits aqueux de polyphénols de gousses de caroube est illustrée par la figure 21.

L'action inhibitrice de l'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube vis-à-vis de la souche *Bacillus cereus* ATCC 14579 ne s'est pas faite sentir avant les 8 et 6 premières heures de culture en présence, respectivement, de 10 et 20 mg de polyphénols/mL d'extrait.

En effet, cette souche continue sa croissance en affichant une amélioration de sa biomasse viable de 4.5, 3.11 et 3.57% dans les intervalles de culture 0-2h, 2-4h et 4-6h à la concentration de 10 mg/mL et, de 3.62 et 3.61% dans les temps 0-2h et 2-4h à la concentration de 20 mg/mL (fig. 22A, 22B et 23A, tableau 6).

Dans l'intervalle de culture 4-6h, *B. cereus* perd 10.12% de viabilité quand il est exposé à 20 mg/mL d'extrait ; alors qu'avec 50 mg/mL, son inhibition par les polyphénols ne s'est pas faite attendre puisque sa viabilité diminue de 0.25, 6.76 et 7.39% dans les intervalles 0-2h, 2-4h et 4-6h, respectivement (fig. 22A, 22B et 23A, tableau 6).

C'est à partir de la 8<sup>ème</sup> heure de culture que *B. cereus* ATCC 14579 ressent l'effet des 10 mg de polyphénols de caroube testés, car il perd à ce moment là 5.56% de sa viabilité (fig. 23B, tableau 6) et sa vitesse de croissance passe de + 0.16 (à t = 6h) à - 0.25 logUFC/h (à t = 8h) (tableau 7).

Après cela, cette concentration en polyphénols (10 mg/mL) devient de plus en plus inhibitrice jusqu'à la 32<sup>ème</sup> heure de culture où il ne reste aucune cellule vivante (fig.21, tableau 6).

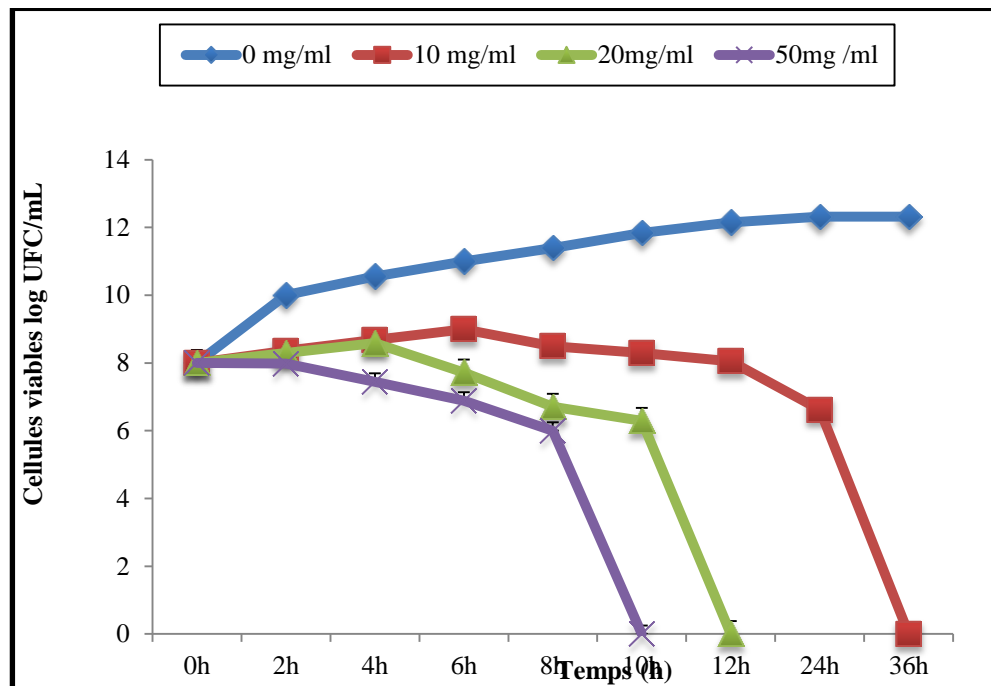
La sensibilité de cette souche semble dépendre de la concentration de polyphénols et du temps d'exposition. En effet, quand elle est cultivée en présence de 20 et 50 mg de polyphénols/mL d'extrait, sa viabilité diminue respectivement de 13.08 et 12.91%, 6.25 et 100% dans les intervalles 6-8h et 8-10h (fig. 23B et 24A, tableau 6). Ainsi, il ne reste plus de cellules vivantes après 10h de culture en présence de 50 mg/mL.

La concentration de 20 mg/mL d'extrait polyphénolique aqueux de gousses de caroube provoque une perte de viabilité de *B. cereus* ATCC14579 de l'ordre de 40.85 et de 100% , respectivement entre la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> (fig. 21 et 24B, tableau 6), et la 12<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> heure de culture; quoique, c'est à la 12<sup>ème</sup> heure de culture que cette souche ne survit plus à la présence de 20 mg de polyphénols/mL, car, déjà, il ne restait que très peu de cellules viables (fig.21).

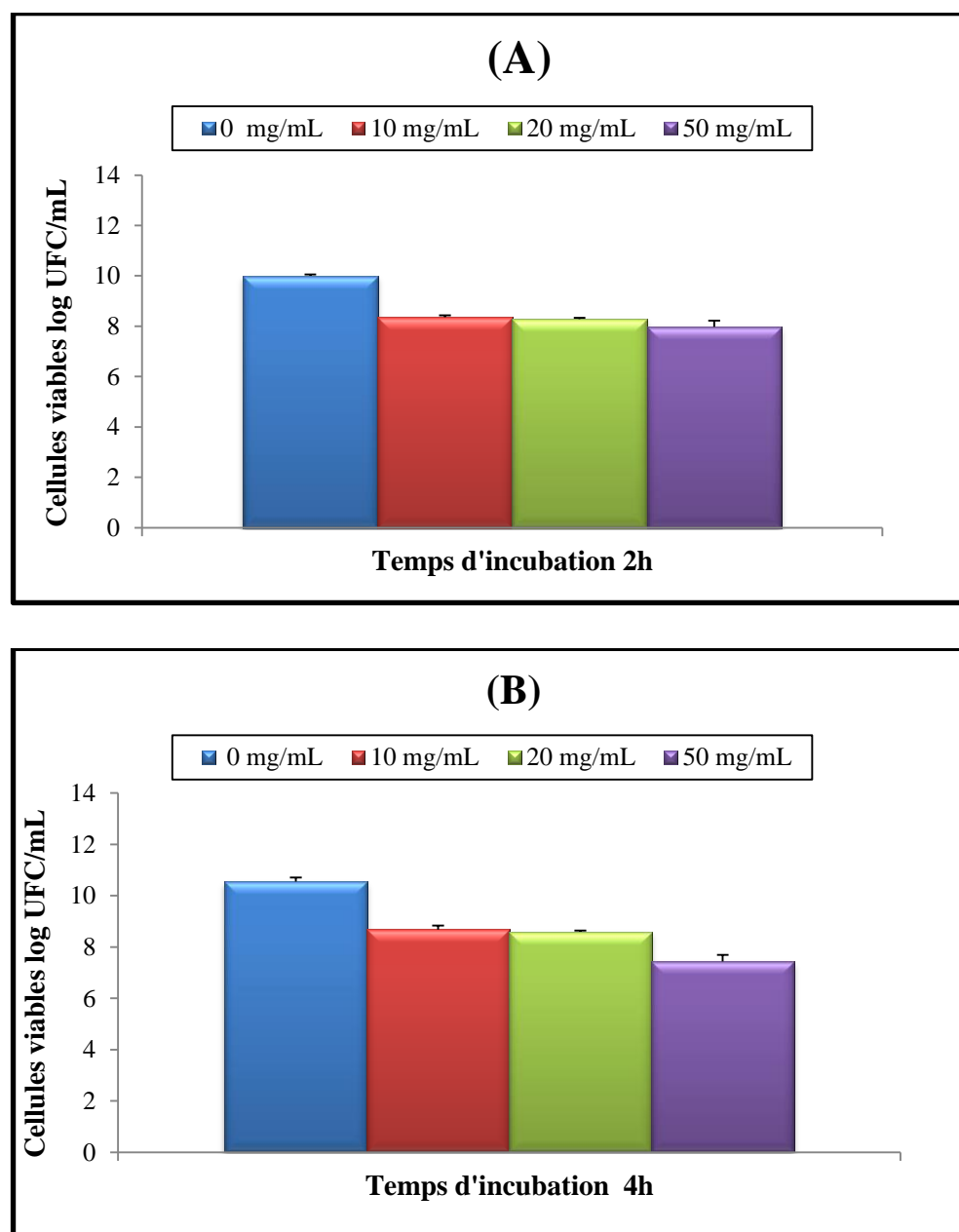
Les vitesses d'inhibition s'accroissent avec le temps d'exposition des cellules aux extraits phénoliques de gousses de caroube (tableau 7).

Jayaprakasha et al., (2003) ont utilisé deux mélanges de solvants (mélange 1 = acétone/ eau/acide acétique et mélange 2 = méthanol/eau/acide acétique) dans la préparation d'extraits de pépins de raisin dont ils ont testé l'effet sur la viabilité de germes pathogènes communs. Leurs observations indiquent que les deux extraits manifestaient une activité inhibitrice sur *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces auteurs avaient également testé l'activité antioxydante de leurs extraits.

Ces observations, ainsi que toutes celles ayant trait aux propriétés biologiques des polyphénols, témoignent, non seulement de l'omni-répartition de ces substances chez les végétaux, mais aussi de l'universalité de leur pouvoir antimicrobien et antioxydant.

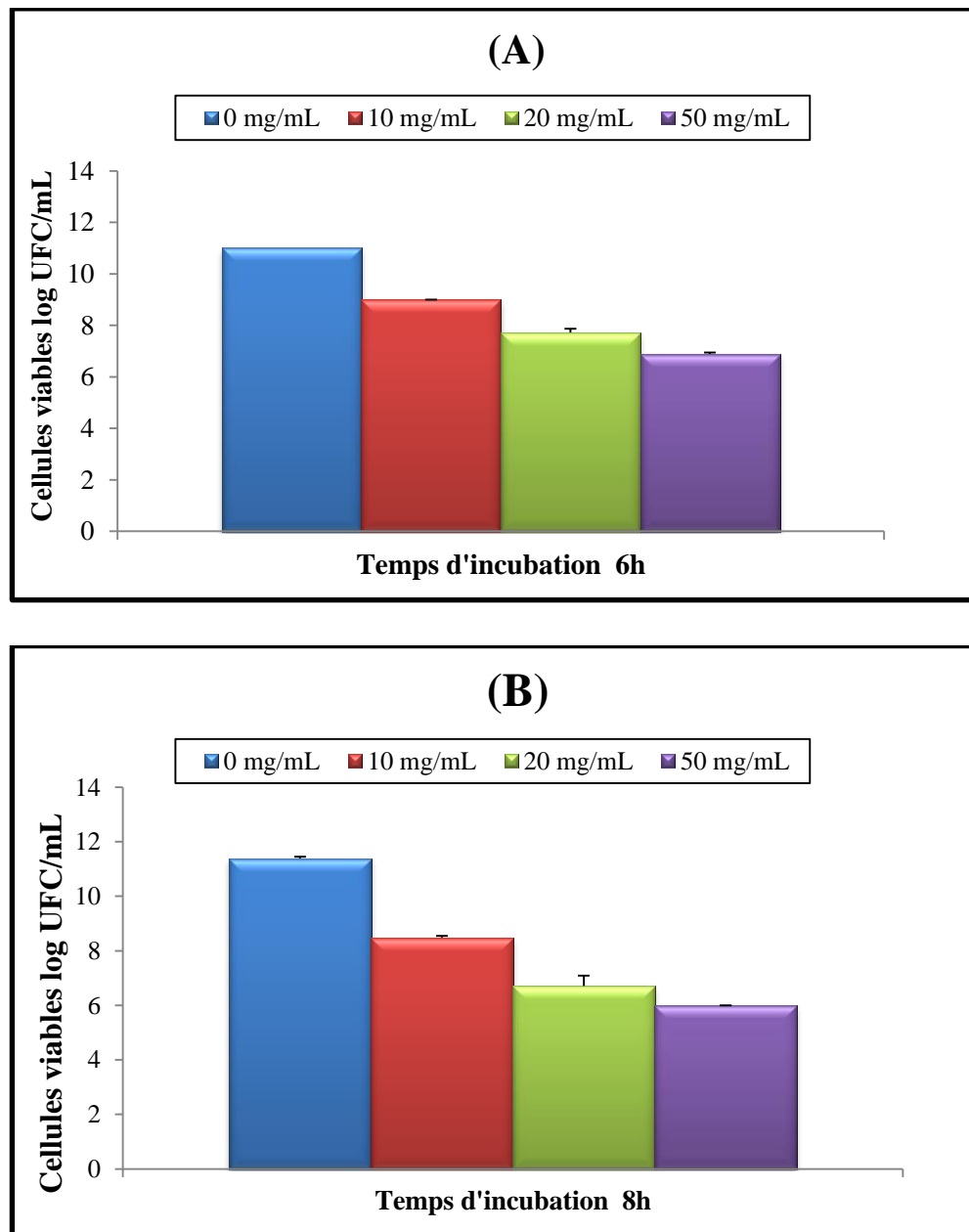


**Figure 21:** Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.



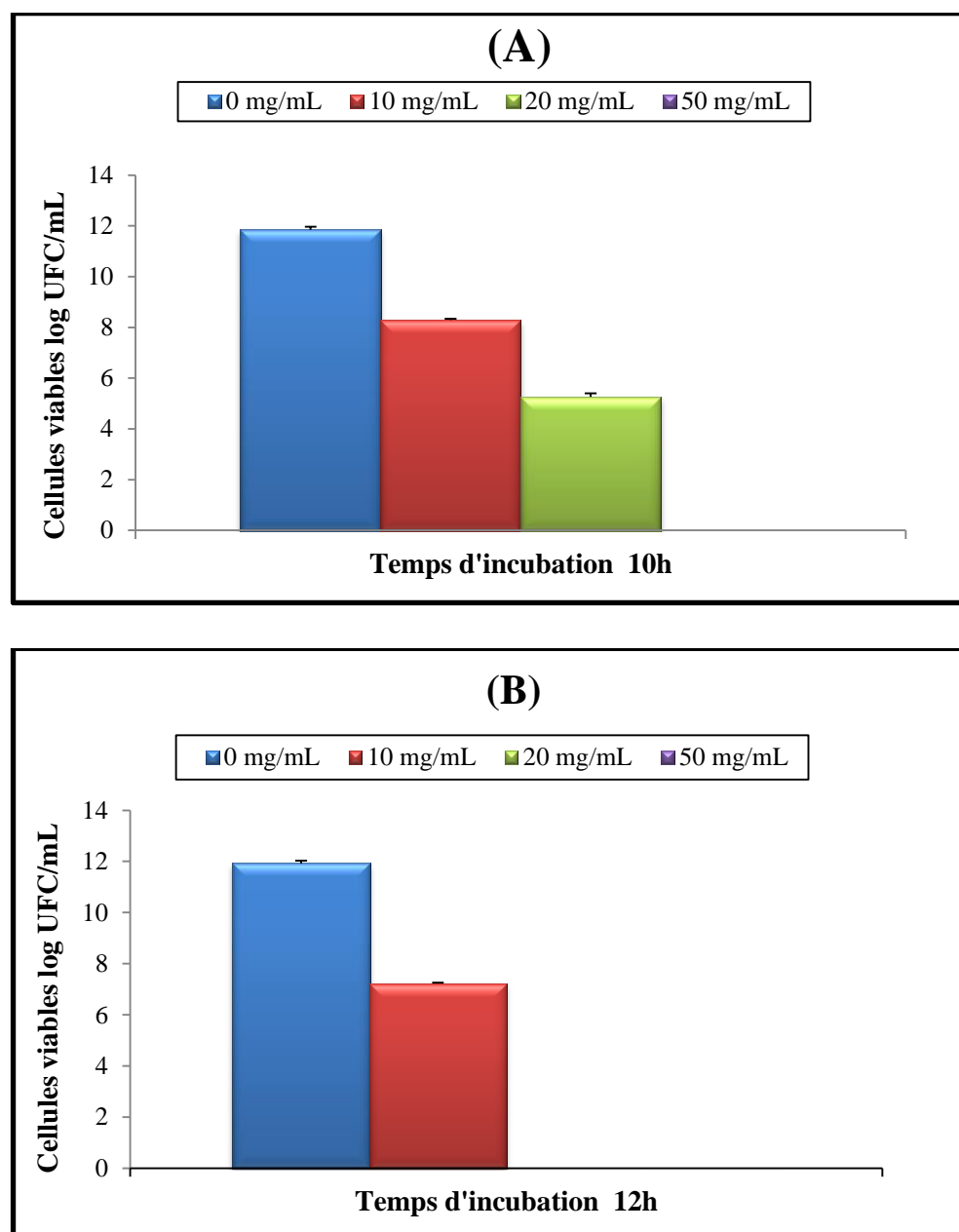
**Figure 22:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 23:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 6h (A) et 8h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.



**Figure 24:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 10h (A) et 12h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 6:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche de *Bacillus cereus* ATCC14579 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+4.5 $\pm$ 0.02	+3.62 $\pm$ 0.07	-0.25 $\pm$ 0.01
<b>2h-4h</b>	+3.11 $\pm$ 0.01	+3.61 $\pm$ 0.04	-6.76 $\pm$ 0.71
<b>4h-6h</b>	+3.57 $\pm$ 0.09	-10.12 $\pm$ 0.08	-7.39 $\pm$ 0.90
<b>6h-8h</b>	-5.56 $\pm$ 0.21	-13.08 $\pm$ 0.18	-12.91 $\pm$ 0.21
<b>8h-10h</b>	-2.35 $\pm$ 0.17	-6.25 $\pm$ 0.03	-100 $\pm$ 2.30
<b>10h-12h</b>	-2.89 $\pm$ 0.34	-65.85 $\pm$ 1.56	-
<b>12h-24h</b>	-17.76 $\pm$ 0.12	00	-
<b>24h-36h</b>	-100 $\pm$ 1.30	-	-

**Tableau 7 :** Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées /h ou d'inhibition (exprimée en - log de cellules inhibées/h) de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.18 $\pm$ 0.01	+0.14 $\pm$ 0.01	-0.01 $\pm$ 0.002
<b>2h-4h</b>	+0.13 $\pm$ 0.009	+0.15 $\pm$ 0.02	-0.20 $\pm$ 0.01
<b>4h-6h</b>	+0.16 $\pm$ 0.02	-0.43 $\pm$ 0.03	-0.2 $\pm$ 0.03
<b>6h-8h</b>	-0.25 $\pm$ 0.07	-0.55 $\pm$ 0.08	-0.49 $\pm$ 0.04
<b>8h-10h</b>	-0.10 $\pm$ 0.02	-0.21 $\pm$ 0.03	-3.00 $\pm$ 0.02
<b>10h-12h</b>	0.12 $\pm$ 0.008	-2.63 $\pm$ 0.04	-
<b>12h-24h</b>	-0.71 $\pm$ 0.03	00	-
<b>24h-36h</b>	-3.31 $\pm$ 0.42	-	-

### III.3.4. Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

L'action inhibitrice de l'extrait phénolique de caroube vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est plus faible par rapport à celle observée chez *S aureus* ATCC 33862 (fig. 25). Déjà, après 2h de contact de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec 50 mg de polyphénols/mL d'extrait provoque une perte de viabilité de l'ordre de 7.87%, contrairement au léger effet stimulant de sa croissance observé avec les concentrations 10 et 20 mg/mL pendant le même intervalle de culture 0-2h, où la biomasse se trouve augmentée de 0.50 et 0.25% avec des vitesses de croissance de l'ordre de 0.02 et 0.01 log UFC/h, respectivement (tableau 8).

Cette plus grande sensibilité de cette souche devient visible dès la 4<sup>ème</sup> heure de culture en présence de 10 et 20 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube puisqu'en l'espace de 2h, on a enregistré des pertes de sa viabilité équivalentes à 3.90 et 1.62 %, respectivement (fig. 26 A et B). L'inhibition continue de s'accroître au cours de l'intervalle 4-6h quel que soit la concentration de polyphénols dans le milieu de culture (fig. 25 et 27A) car on enregistre des pertes de biomasses de l'ordre de 4.4, 7.73 et 5.49% correspondant à des vitesses d'inhibition équivalentes à 0.17, 0.3 et 0.2 log UFC/h en présence de 10, 20, 50 mg/mL respectivement (tableau 8 et 9).

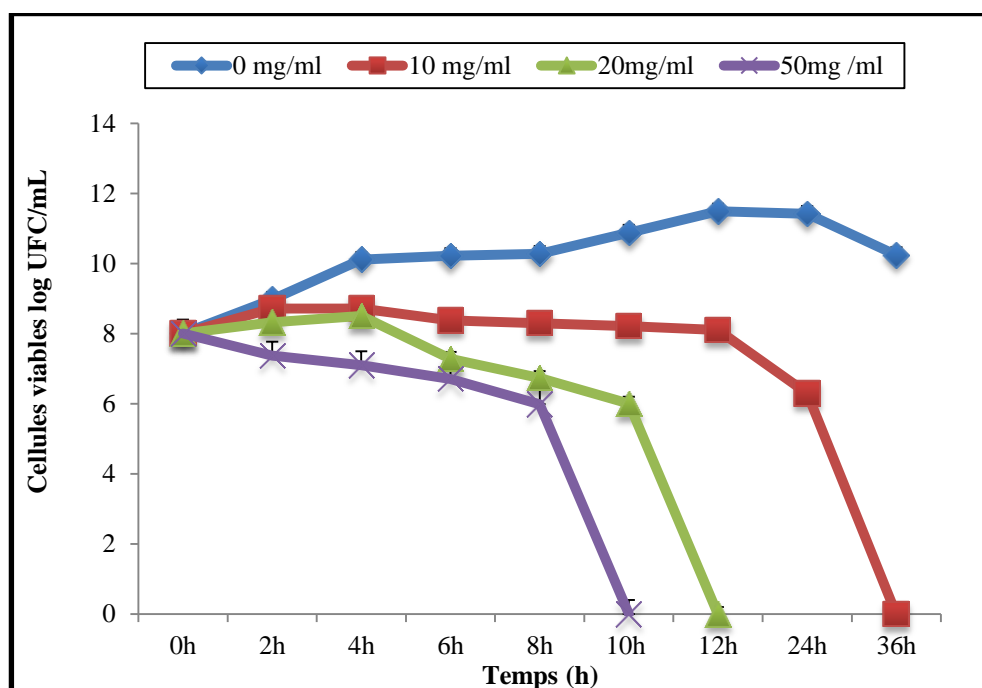
Une réduction de biomasse de l'ordre de 0.08 (1.08%) , 0.55 (7.55%) et 0.72 (10.73%) log (fig. 25 et 27B, tableau 8) a été observée après la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube au bout de 8h avec des vitesses d'inhibition équivalentes à 0.51, 0.27 et 0.36 log UFC/h (tableau 9).

L'activité inhibitrice d'extrait phénolique de caroube vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 continue à chuter après 10h d'incubation car 1.09 (soit 15%) et 0.73 log UFC/mL (soit 11%) de la biomasse enregistrée au temps t = 8h sont perdus au bout de 2h de culture en présence de 10 et 20 mg/mL avec des vitesses d'inhibition respectives de 0.54 et 0.36 log UFC/h (fig. 28A, tableaux 8 et 9). Cette inhibition était plus importante (plus de 89% de perte de viabilité) avec la plus forte concentration (50mg/mL) où cette souche a été totalement inhibée (fig. 28A, tableau 8).

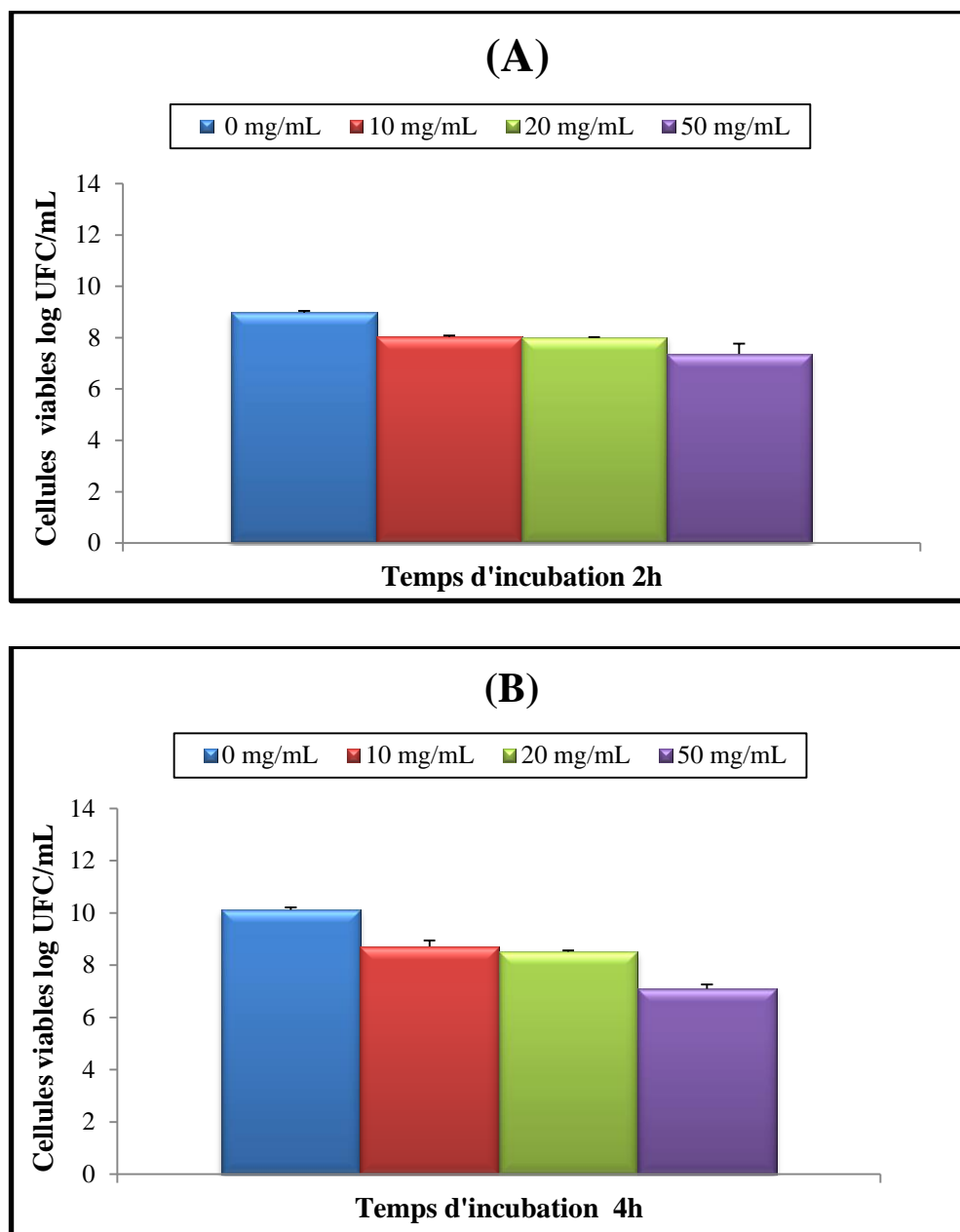
Cette sensibilité continue d'augmenter si le temps de culture est prolongé à 12h et elle se manifeste par une légère perte de viabilité de *S. aureus* ATCC 25923 de l'ordre de 1.76% (soit 0.11 log UFC / mL) en présence de 10 mg/mL (fig. 28B, tableau 8). En revanche, cette sensibilité est très forte dans la culture contenant 20 mg/mL d'extrait phénolique car plus de 89% des cellules

restantes au temps  $t = 10\text{h}$  sont perdues 2h après avec une vitesse d'inhibition voisine de  $3.01 \log \text{UFC/h}$  (fig.25 et 28B, tableaux 8 et 9) et il ne reste plus de cellules vivantes au point 24h.

Après 24h de contact (fig. 29A), l'action inhibitrice des polyphénols utilisés à  $10\text{mg/mL}$  devient plus importante (13.11% de perte de viabilité). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est presque totalement inhibée après 36h (100%) (fig. 25)

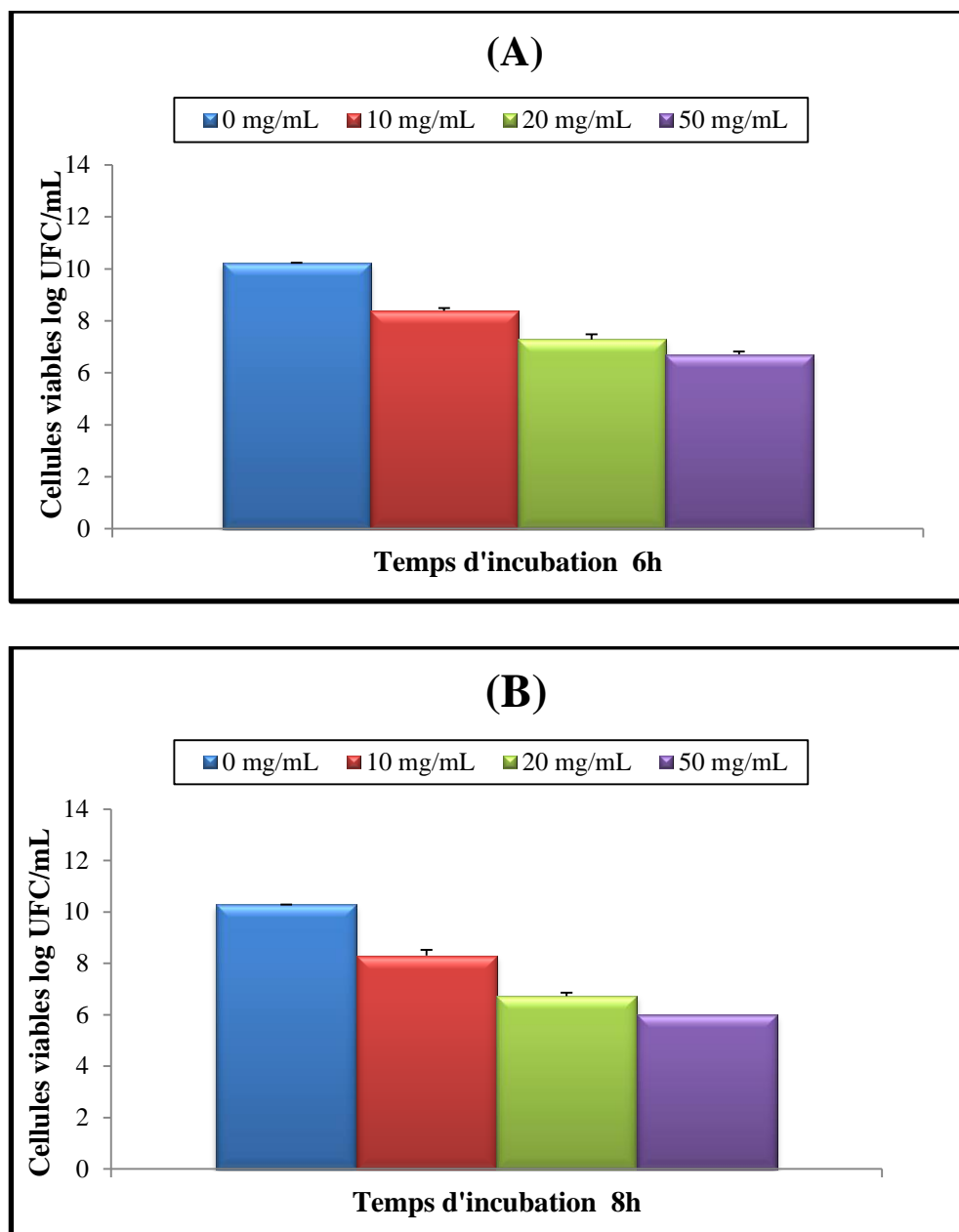


**Figure 25:** Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



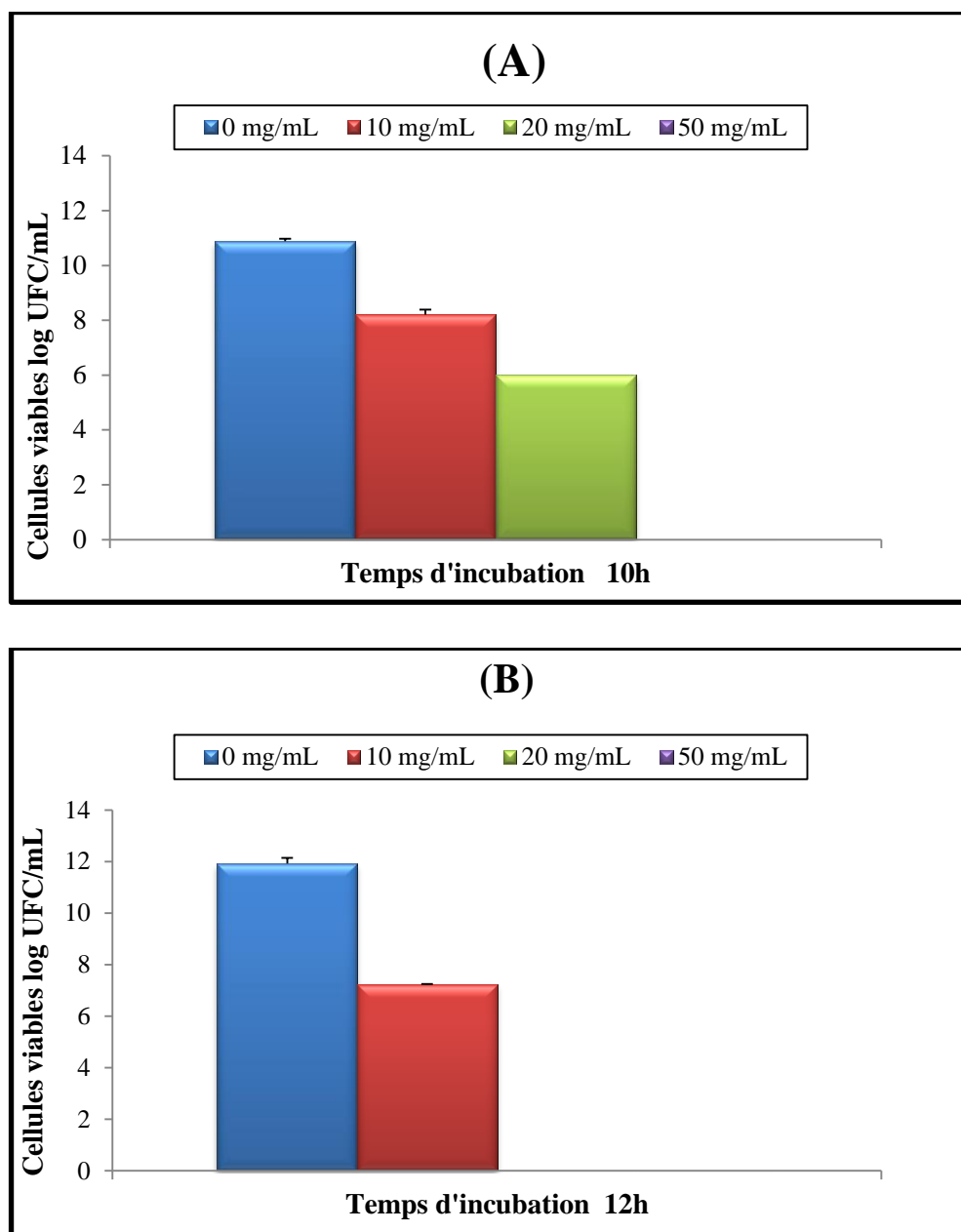
**Figure 26 :** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 27:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 28:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **10h (A)** et **12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 8:** Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.50 $\pm$ 0.05	+0.25 $\pm$ 0.01	-7.87 $\pm$ 0.10
<b>2h-4h</b>	-3.90 $\pm$ 0.20	-1.62 $\pm$ 0.09	-3.66 $\pm$ 0.05
<b>4h-6h</b>	-4.40 $\pm$ 0.40	-7.73 $\pm$ 0.13	-5.49 $\pm$ 0.13
<b>6h-8h</b>	-1.08 $\pm$ 0.08	-7.55 $\pm$ 0.27	-10.73 $\pm$ 0.41
<b>8h-10h</b>	-14.93 $\pm$ 0.70	-10.84 $\pm$ 0.16	-89.26 $\pm$ 1.14
<b>10h-12h</b>	-1.76 $\pm$ 0.06	-89.15 $\pm$ 1.30	00
<b>12h-24h</b>	-13.11 $\pm$ 0.19	00	-
<b>24h-36h</b>	-100 $\pm$ 0.30	-	-

**Tableau 9 :** Vitesse de croissance (exprimée en + log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en - log de cellules inhibées /h) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.02 $\pm$ 0.003	+0.01 $\pm$ 0.002	-0.631 $\pm$ 0.02
<b>2h-4h</b>	-0.16 $\pm$ 0.02	-0.06 $\pm$ 0.001	-0.23 $\pm$ 0.01
<b>4h-6h</b>	-0.17 $\pm$ 0.01	-0.30 $\pm$ 0.04	-0.20 $\pm$ 0.06
<b>6h-8h</b>	-0.04 $\pm$ 0.005	-0.27 $\pm$ 0.07	-0.36 $\pm$ 0.10
<b>8h-10h</b>	-0.54 $\pm$ 0.07	-0.36 $\pm$ 0.08	-2.98 $\pm$ 0.60
<b>10h-12h</b>	-0 .05 $\pm$ 0.001	-3.01 $\pm$ 0.30	00
<b>12h-24h</b>	-0.4 $\pm$ 0.02	00	-
<b>24h-36h</b>	-2.65 $\pm$ 0.06	-	-

Ben hsouna et al. (2012) ont testé l'activité antimicrobienne d'extrait méthanolique de caroube sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui a donné une CMI de 0.31 mg/mL. Par contre, Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres avaient plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en était pourvus, ce qui pouvait conduire à une augmentation de leur affinité chimique vis-à-vis des lipides membranaires ; c'est ce qui a conduit cet auteur à laisser penser que la cible microbienne de ces flavonoïdes pourrait être la membrane cytoplasmique.

Ben hsouna et al. (2012) indiquent que toutes les bactéries testées se sont révélées plus sensibles aux actions inhibitrices de l'extrait méthanolique de *Ceratonia siliqua* L. que l'antibiotique gentamycine qu'ils ont utilisé comme référence. Ces auteurs avaient constaté que les souches les plus sensibles étaient *S. aureus* ATCC 6536, *S. aureus* ATCC 25923 et *S. epidermis* ATCC 12228 avec des zones d'inhibitions respectives de 22 mm, 20 mm et 17 mm.

Kholkhal et al. (2012) ont testé l'effet antimicrobien de différents extraits d'*Eryngium maritimum* (au méthanol, acétone, butanol et à l'acétate d'éthyle) sur plusieurs souches pathogènes y compris *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats de ces auteurs ont montré que c'était *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui a été la plus sensible (9 mm) suivie par *Escherichia coli* ATCC 25922 (6.5 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (6 mm) en présence de 50 mg/mL d'extrait phénolique à l'acétone d'*E. maritimum*. Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 était la souche la plus résistante à ces extraits.

Abdellaoui et al. (2013) ont exploré l'effet antibactérien des extraits aqueux de Rhodophycées: *Grateloupia doryphora* et *Gymnogongrus patens* sur *Escherichia coli* ATCC 25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* et *Salmonella enteritidis*.

Ces auteurs ont constaté que tous les extraits testés inhibent les bactéries à Gram positif et à Gram négatif à l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui a manifesté une très forte résistance. En revanche, la plus forte sensibilité revient à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### III.3.5. Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862

Après 2h de culture, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, affiche une légère croissance en présence de 10 (+0.24 log UFC/mL soit +3%) et 20 mg/mL (+0.22 log UFC/mL soit +2.75%) d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube correspondant à des vitesses de croissance respectives de 0.12 et 0.11 log UFC/h (fig. 29 et 30A, tableaux 10 et 11).

En revanche, la plus forte concentration en polyphénols testée (50 mg/mL) exerce un effet inhibiteur notable sur cette souche dès les deux premières heures de culture où on a enregistré une perte de viabilité de l'ordre 0.84 log UFC/mL (soit -10.5%) correspondant à une vitesse d'inhibition de -0.42 log UFC/h (fig.29 et 30A, tableaux 10 et 11).

Ce léger taux de croissance continue à s'exprimer pendant l'intervalle 2-4h d'exposition aux différentes concentrations d'extraits phénoliques de caroube, par une faible évolution en présence de 10 mg/mL (+2.91%) et de 20 mg/mL (4.13%) (fig. 29 et 30B, tableau 10). Une perte de viabilité équivalente à 0.02% (tableau 10) a été obtenue en présence de 50 mg/mL.

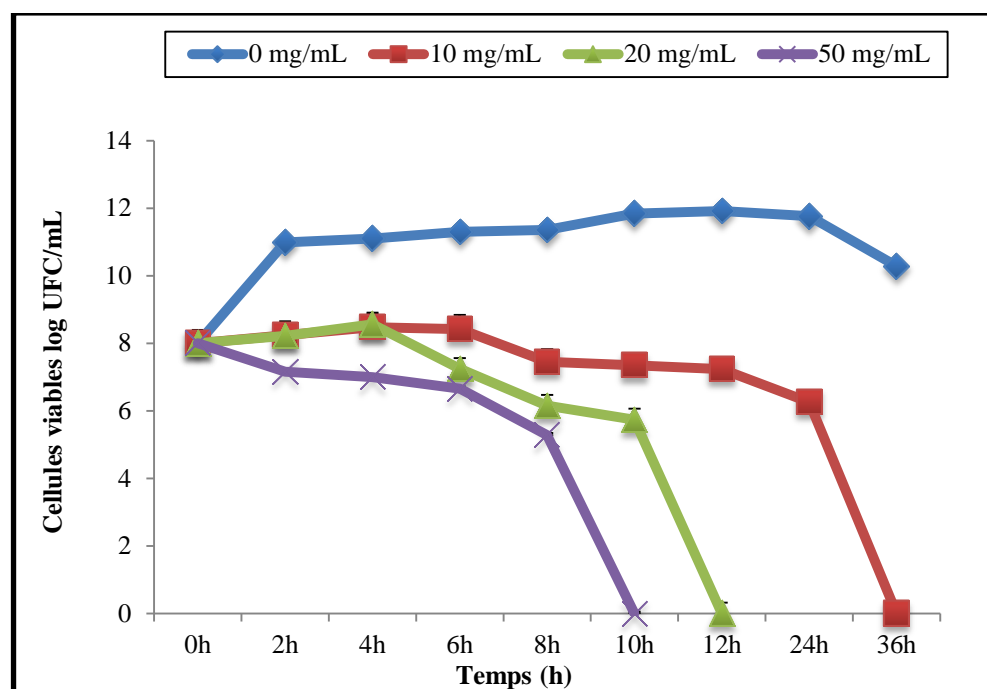
Lorsque cette souche est cultivée 6h avec 10, 20 et 50 mg/mL, une réduction de biomasse comprise entre 0.07% et 14.42% (tableau 10) correspondant à des vitesses d'inhibition voisines de 0.03 et 0.66 log UFC/h a été observée (fig. 29 et 31A, tableau 11).

La prolongation du temps de culture à 8h induit une perte de viabilité de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 plus importante (fig. 29 et 31B) en présence de 10, 20 et 50 mg/mL et qui se chiffre, respectivement, à 11.52%, 15.05 % et 20.72% (fig.31B, tableau 10).

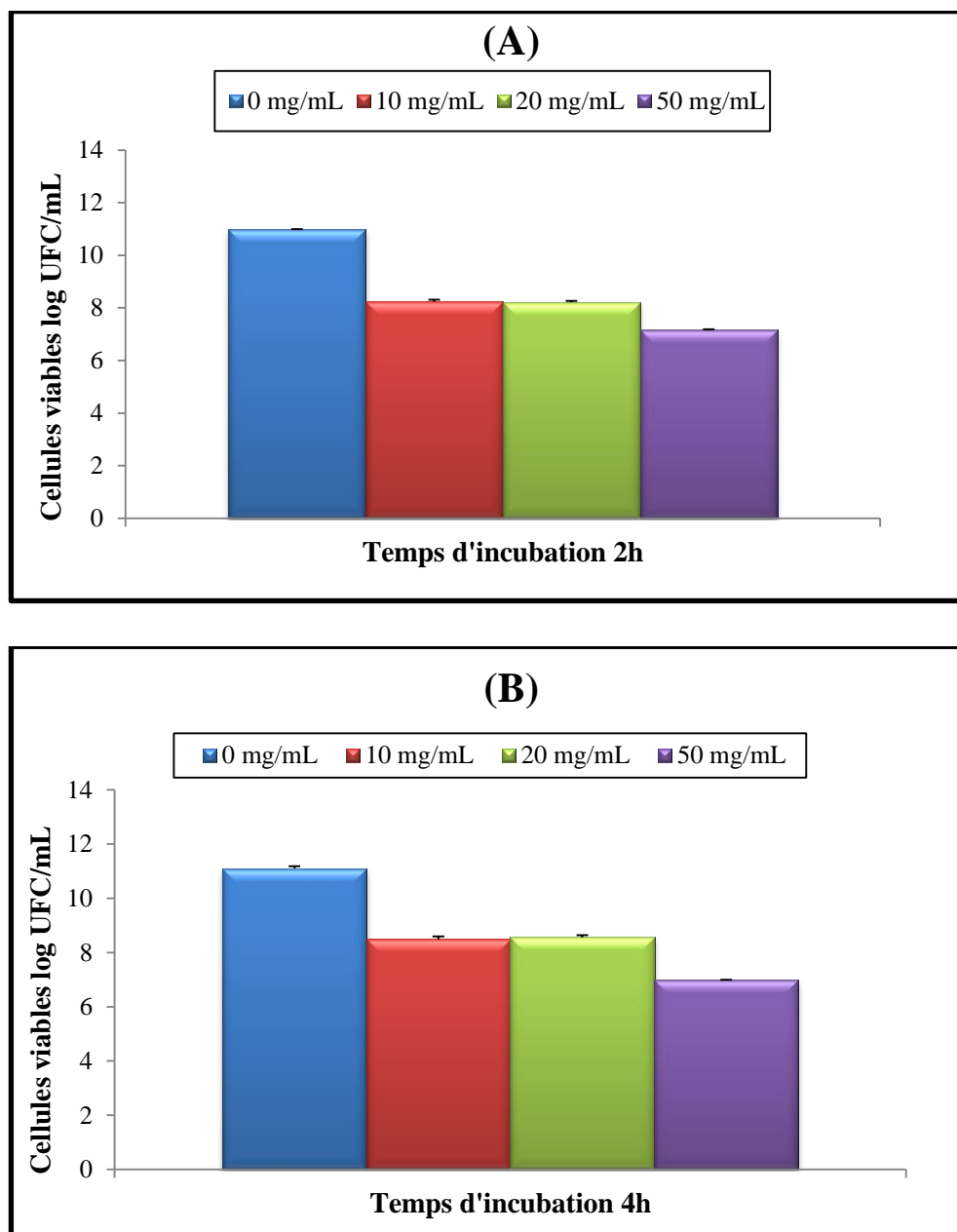
La figure 32A illustre les pertes de biomasse survenues dans l'intervalle de culture 8-10h de *S. aureus* ATCC 33862 et qui sont de l'ordre de 1.33 et 6.66% en présence, respectivement, de 10 et 20 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube. Au cours de ce même intervalle de culture, cette souche perd 100% (soit 5.80 log UFC) de sa viabilité sous l'effet de 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube (fig. 29 et 32A, tableau 10).

Cette sensibilité poursuit son augmentation si le temps de culture est prolongé à 12h et s'exprime par une inhibition de 1.63 et 100% en présence de 10 et 20 mg/mL; ce qui représente une perte de biomasse de l'ordre de 0.12 et 5.74 log UFC/mL respectivement (fig. 29 et 32B, tableau 10). Les vitesses d'inhibition de cette souche sont reportées au tableau 11.

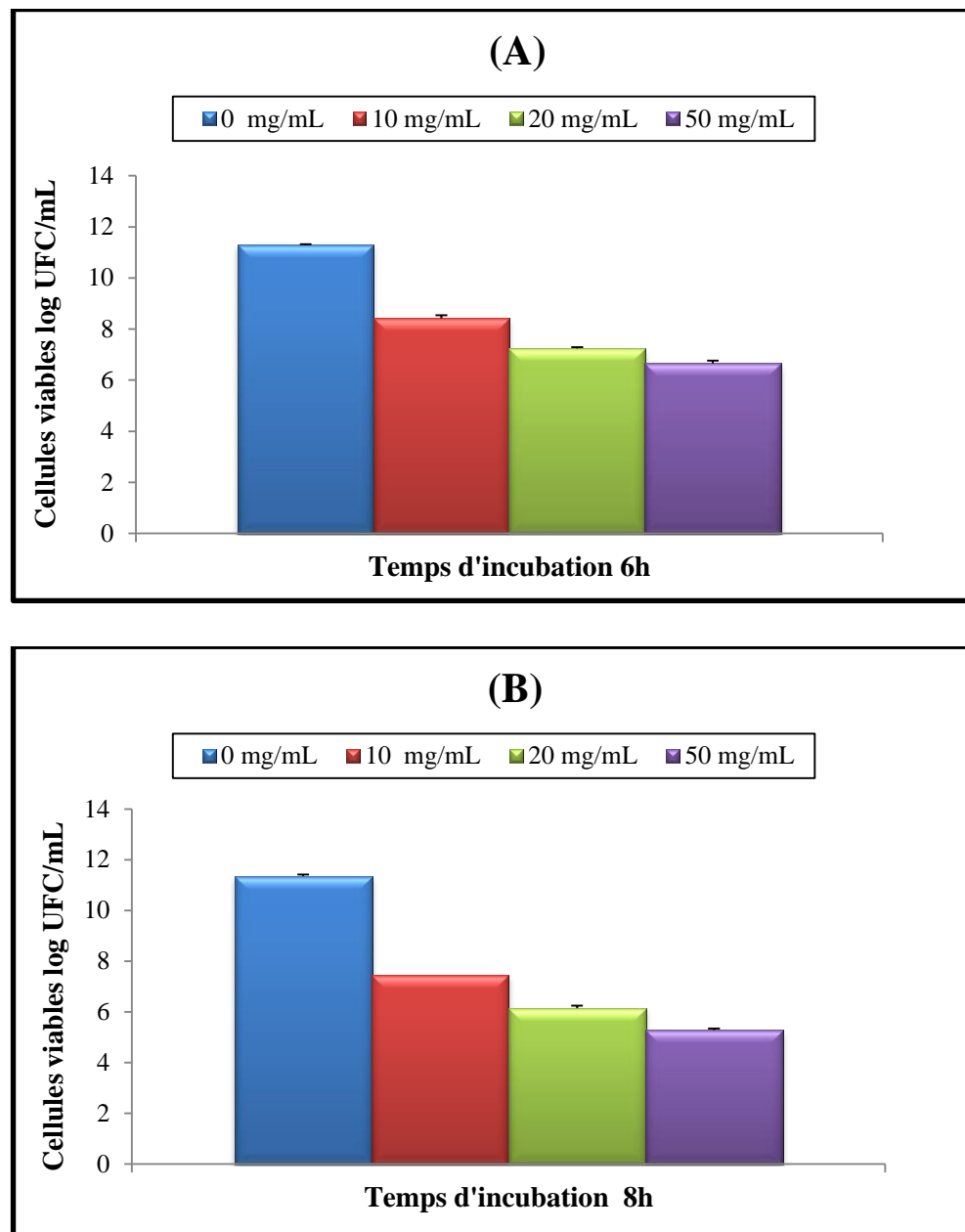
Après 24h de culture, seules les cellules cultivées en présence de 10 mg/mL subsistent à une concentration légèrement supérieure à 6 log UFC/mL. Cette biomasse perd 100% de sa viabilité dans l'intervalle de culture 24-36h qui a suivi.



**Figure 29:** Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC33862 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10,20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

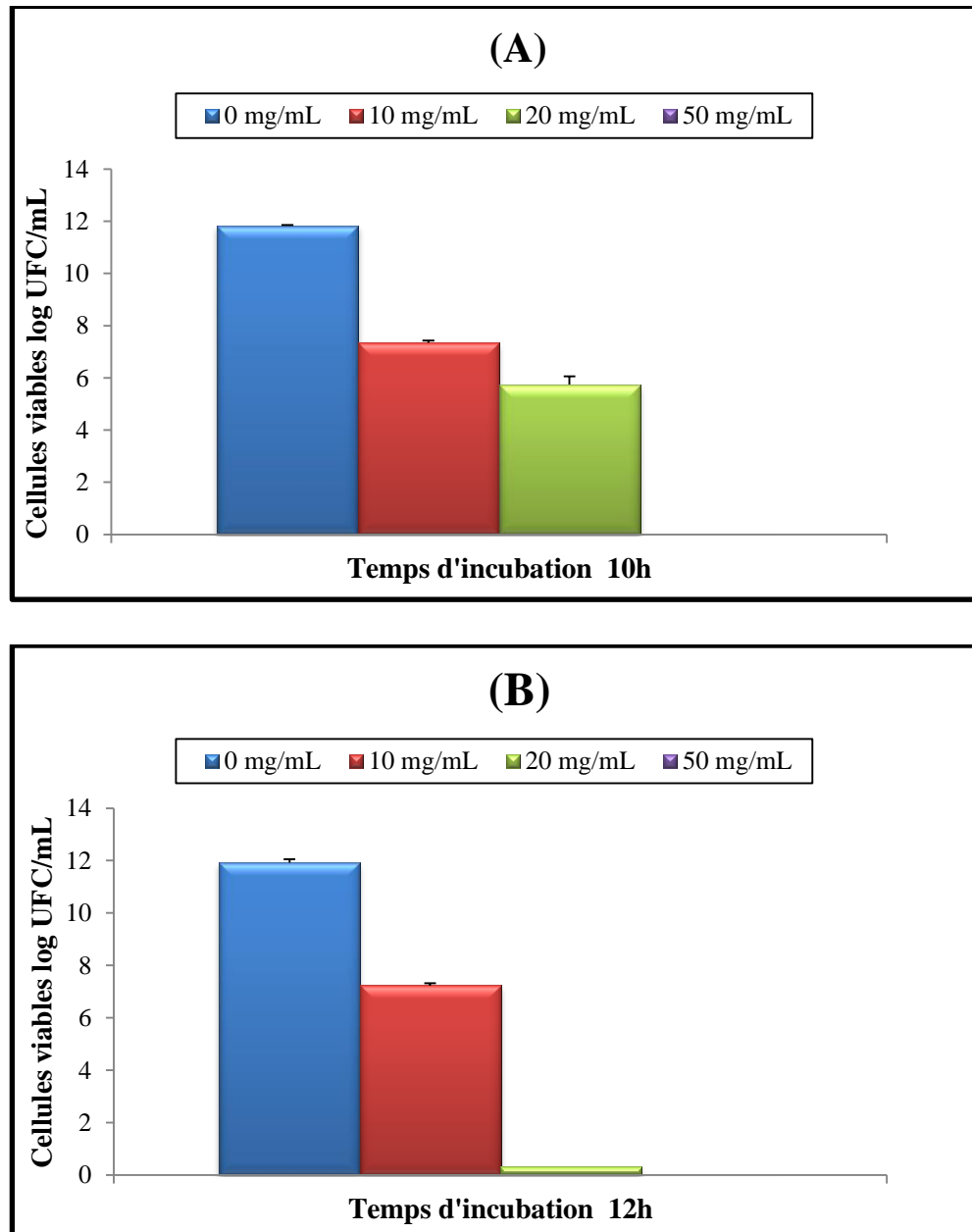


**Figure 30:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 31:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 6h (A) et 8h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 32:** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 10h (A) et 12h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

La sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 vis-à-vis des différentes concentrations d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine et al., 2006).

Biyiti et al. (2004) avaient observé que des extraits phénoliques au mélange éthanol-eau de *Pyrenacantha standtii* exerçaient un effet bactéricide sur *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* et sur *S. aureus* à 9.37, 4.68 et 9.37 mg/mL, respectivement.

En effet, Agbakwuru (2002), utilisant la même plante, a observé une faible action bactériostatique de son extrait méthanolique sur *E. coli* et *S. aureus*. Cette divergence entre les résultats des deux études est sûrement due à la nature des solvants d'extraction.

Selon les résultats de Ben hsouna et al. (2012), la souche *S. aureus* ATCC 6536 était la plus sensible vis-à-vis l'extrait méthanolique de poudre de caroube.

Weiduo et al. (2006) ont testé l'effet antimicrobien de thé vert chinois sur des bactéries pathogènes tels que *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Ils ont trouvé que l'extrait aqueux de thé vert exerce un effet antimicrobien contre tous les germes testés avec une concentration de 500 µg/mL. En effet, la souche *Staphylococcus aureus* était inhibée après 5 à 6h d'incubation.

Turkmen Erol et al. (2009) ont montré que les diamètres des zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* obtenus avec des extraits phénoliques éthyliques de feuilles fraîches de thé ((15 et 8.7mm, respectivement) étaient plus élevés que ceux obtenus avec des feuilles sèches de thé (11mm et 8.2mm). Leurs résultats montrent aussi que *S. aureus* est plus sensible que *B. cereus* vis-à-vis des polyphénols de thé vert.

**Tableau 10 :** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+3.20 $\pm$ 0.19	+2.75 $\pm$ 0.67	-10.5 $\pm$ 0.58
<b>2h-4h</b>	+2.91 $\pm$ 0.14	+4.13 $\pm$ 0.70	-0.02 $\pm$ 0.001
<b>4h-6h</b>	-0.07 $\pm$ 0.002	-14.42 $\pm$ 1.02	-4.85 $\pm$ 0.98
<b>6h-8h</b>	-11.52 $\pm$ 0.63	-15.05 $\pm$ 1.10	-20.72 $\pm$ 1.46
<b>8h-10h</b>	-1.33 $\pm$ 0.15	-6.66 $\pm$ 0.97	-100 $\pm$ 3.21
<b>10h-12h</b>	-1.63 $\pm$ 0.10	-100 $\pm$ 2.31	00
<b>12h-24h</b>	-13.41 $\pm$ 1.36	00	
<b>24h-36h</b>	-100 $\pm$ 2.36	-	

**Tableau 11 :** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.12 $\pm$ 0.009	+0.11 $\pm$ 0.02	-0.42 $\pm$ 0.03
<b>2h-4h</b>	+0.12 $\pm$ 0.008	+0.17 $\pm$ 0.01	-0.08 $\pm$ 0.001
<b>4h-6h</b>	-0.03 $\pm$ 0.001	-0.66 $\pm$ 0.04	-0.17 $\pm$ 0.02
<b>6h-8h</b>	-0.48 $\pm$ 0.03	-0.54 $\pm$ 0.02	-0.69 $\pm$ 0.04
<b>8h-10h</b>	-0.05 $\pm$ 0.002	-0.20 $\pm$ 0.04	-2.90 $\pm$ 0.09
<b>10h-12h</b>	-0.06 $\pm$ 0.003	-2.87 $\pm$ 0.09	00
<b>12h-24h</b>	-0.48 $\pm$ 0.002	00	-
<b>24h-36h</b>	-3.23 $\pm$ 0.22	-	-

### III.3.6. Cinétique de croissance de *Shigella sonnei* ATCC p4001

Après 2h de culture, *Shigella sonnei* ATCC p4001, affiche une légère croissance en présence de 10 (+0.6 log UFC/mL soit +7.5%), 20 (+0.44 log UFC/mL soit +5.5%) et 50 mg/mL (+0.32 log UFC/mL soit +4%) d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube correspondant à des vitesses de croissance respectives de 0.3, 0.22, 0.16 log UFC/h (fig. 33 et 34A, tableaux 12 et 13).

La croissance de cette souche diminue entre 2 et 4h de culture en présence de 10 mg/mL d'extrait phénolique (vitesse de croissance = - 0.16 log UFC/h) par rapport à ce qu'elle était dans l'intervalle 0-2h (vitesse de croissance = + 0.3 log UFC/h), mais continue à être stimulée (+ 3.72% de biomasse). Cependant, *Shigella sonnei* ATCC p4001 est touchée dans sa croissance à la 4<sup>ème</sup> heure de culture en présence de 20 (- 7.70% de biomasse) et de 50 mg/mL (-7.57% de biomasse) d'extrait phénolique de gousses de caroube (fig. 33 et 34B, tableaux 12 et 13).

La concentration de 10 mg/mL d'extrait phénolique devient inhibitrice de la croissance de *Shigella sonnei* à la 6<sup>ème</sup> heure de culture (- 1.44% de biomasse et accuse une perte de vitesse de croissance (- 0.06 log UFC/h) (fig.33 et 35A, tableau 12 et 13). L'inhibition se poursuit entre la 4<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> heure de culture en présence de 20 (- 7.95% de biomasse et perte de vitesse de -0.32) et de 50 mg/mL d'extrait phénolique (- 10.79% de biomasse et perte de vitesse de -0.36 log UFC /h) (fig.33 et 35A, tableau 12 et 13).

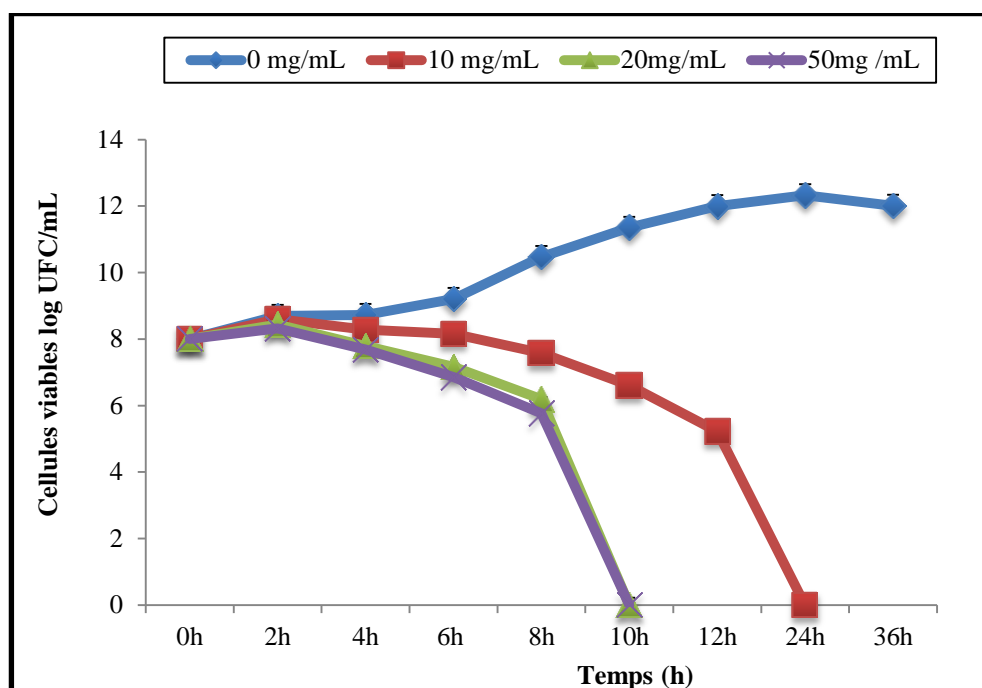
Il semblerait que le temps d'exposition de *Shigella sonnei* aux polyphénols de caroube est un facteur déterminant, à côté de la concentration en ces substances, dans l'expression et du niveau d'inhibition de la croissance.

En effet, après la 6<sup>ème</sup> heure de culture, la biomasse de cette souche et la vitesse de sa croissance sont réduites, respectivement de 7.10 et 0.29, 13.66 et 0.49, 15.88% et 0.55 log UFC/h à la 8<sup>ème</sup> heure (fig.33 et 35B); de 18.33 et 0.69, 88.33 et 3.5, 100% et 2.88 log UFC/h à la 10<sup>ème</sup> heure aux concentrations de 10, 20 et 50 mg/mL d'extraits phénoliques (fig. 33 et 36A, tableaux 12 et 13).

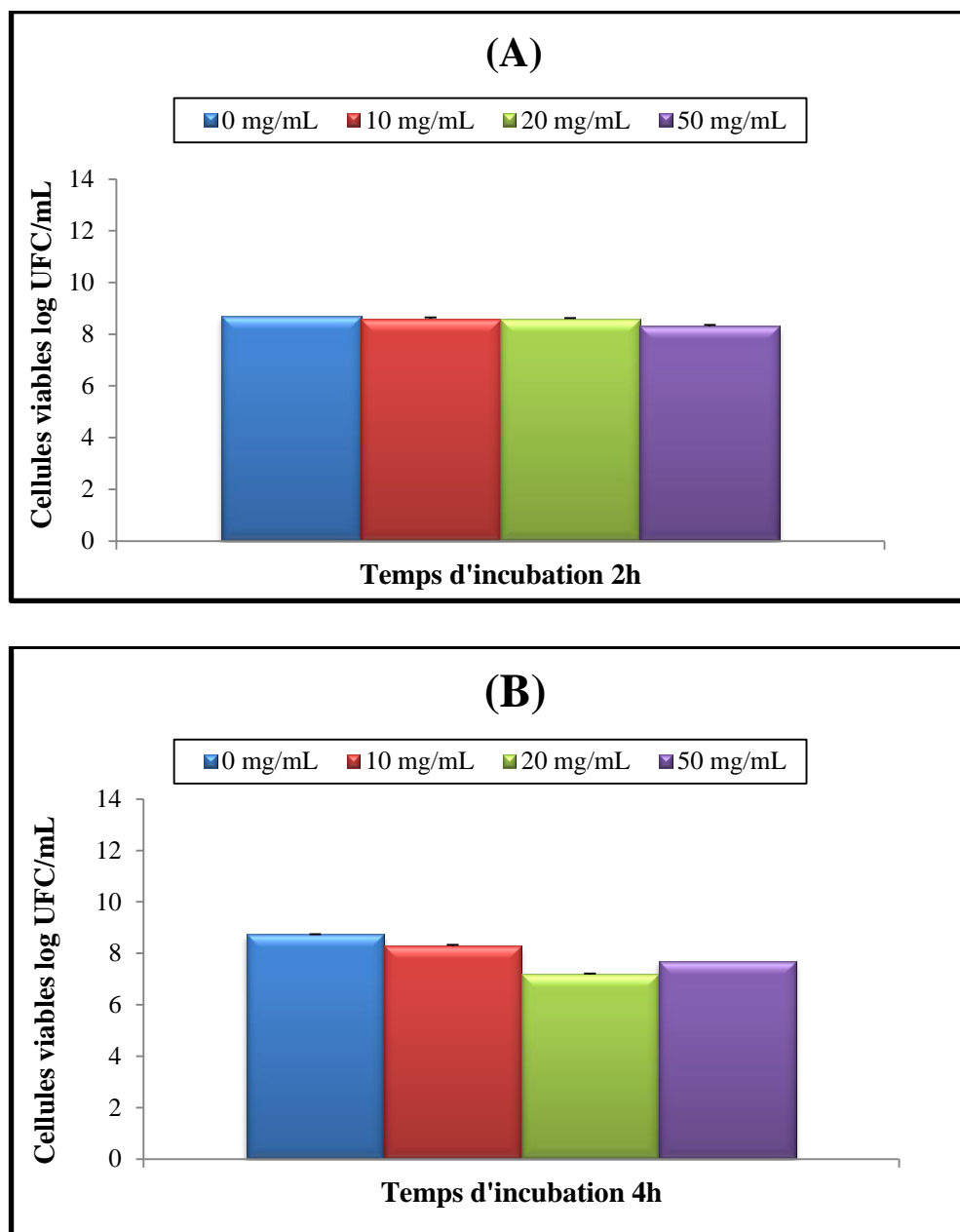
Dans l'intervalle de culture 10-12h, il y a un effondrement de la biomasse *Shigella sonnei* en présence de 10 mg/mL d'extrait phénolique (- 78.97 soit presque - 80%) dû à une très forte réduction de la vitesse de croissance de cette souche (fig. 33 et 36B, tableau 12 et 13). A cette

concentration en polyphénols, l'inhibition totale de *Shigella sonnei* ATCC p4001 n'a été obtenue qu'après de 24h.

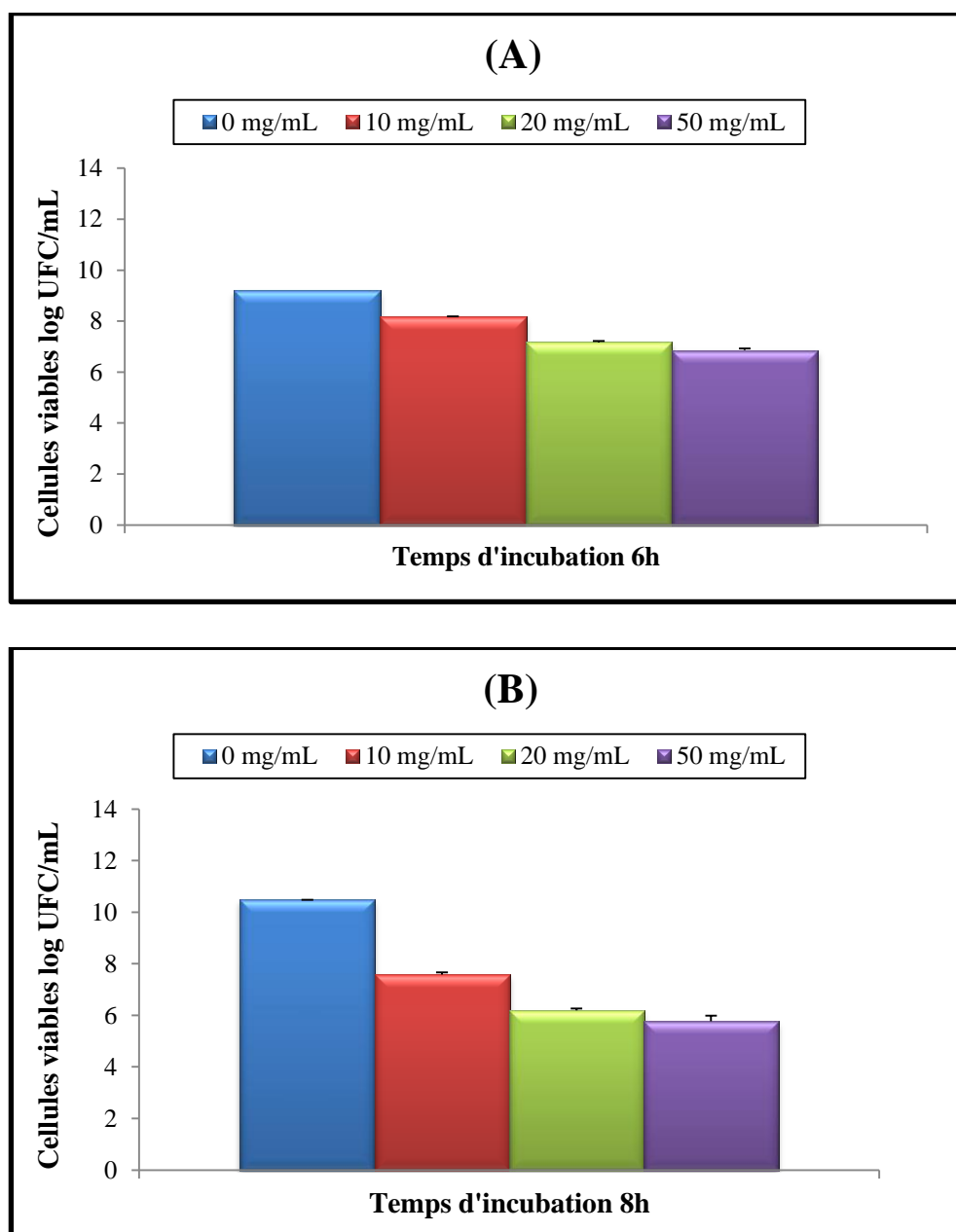
En revanche, dans les autres cultures où la concentration en polyphénols était de 20 et 50 mg/mL d'extrait, il ne subsistait aucune cellule vivante au temps 12h car l'inhibition était déjà totale à ce moment-là.



**Figure 33:** Cinétique de croissance de *Shigella sonnei* ATCC p 4001 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ±SD.

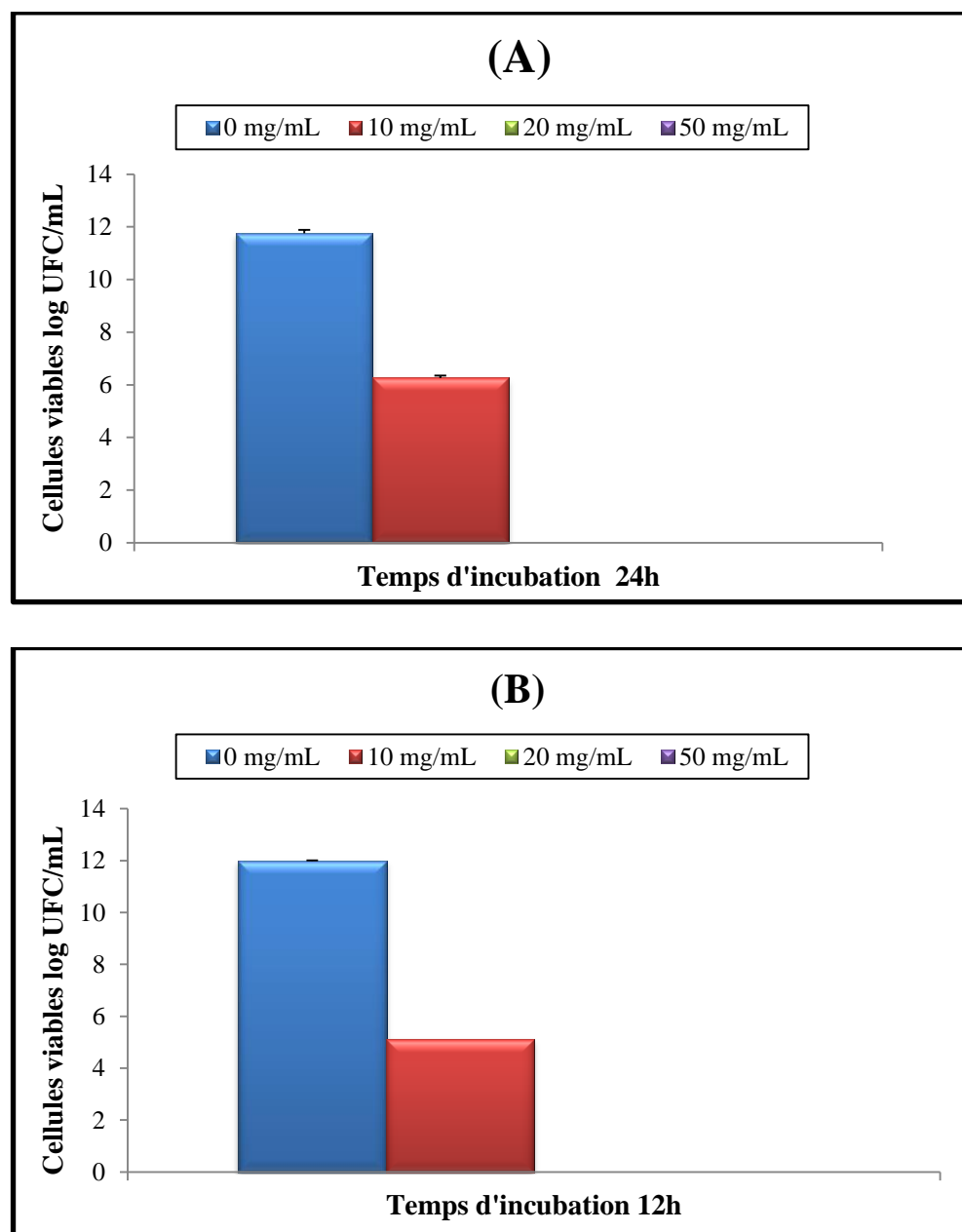


**Figure 34:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 35:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant **6h (A)** et **8h (B)** de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 36:** Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* ATCC p4001 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 10h (A) et 12h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 12:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Shigella sonnei* ATCC p4001 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+7.5 $\pm$ 0.0	+5.5 $\pm$ 0.07	+4.12 $\pm$ 0.08
<b>2h-4h</b>	+3.72 $\pm$ 0.05	-7.70 $\pm$ 0.60	-7.57 $\pm$ 0.16
<b>4h-6h</b>	-1.44 $\pm$ 0.03	-7.95 $\pm$ 0.48	-10.79 $\pm$ 0.09
<b>6h-8h</b>	-7.10 $\pm$ 0.08	-13.66 $\pm$ 0.90	-15.88 $\pm$ 0.17
<b>8h-10h</b>	-18.33 $\pm$ 0.68	-88.33 $\pm$ 2.30	-100 $\pm$ 1.32
<b>10h-12h</b>	-78.97 $\pm$ 2.48	00	00
<b>12h-24h</b>	00	-	
<b>24h-36h</b>	00	-	

**Tableau 13:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Shigella sonnei* ATCC p4001 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.3 $\pm$ 0.02	+0.22 $\pm$ 0.01	+0.16 $\pm$ 0.01
<b>2h-4h</b>	-0.16 $\pm$ 0.009	-0.67 $\pm$ 0.06	-0.32 $\pm$ 0.02
<b>4h-6h</b>	-0.06 $\pm$ 0.001	-0.32 $\pm$ 0.04	-0.36 $\pm$ 0.04
<b>6h-8h</b>	-0.29 $\pm$ 0.03	-0.49 $\pm$ 0.02	-0.55 $\pm$ 0.07
<b>8h-10h</b>	-0.69 $\pm$ 0.02	-3.5 $\pm$ 0.07	-2.88 $\pm$ 0.08
<b>10h-12h</b>	-2.61 $\pm$ 0.70	00	00
<b>12h-24h</b>	00	-	-
<b>24h-36h</b>	00	-	-

### III.3.7. Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC 11778

Après deux heures de culture, *Bacillus cereus* ATCC11778 réagit très favorablement à la présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube puisque sa vitesse de croissance est, respectivement, boostée de + 0.61, + 0.38 et + 0.33 log UFC/h se répercutant sur la biomasse qui augmente de + 15.25, + 9.62 et 8.25%, respectivement (fig. 37 et 38A, tableau 14 et 15).

Dans l'intervalle de culture 2-4h, cette souche commence à ressentir la présence de polyphénols dans son milieu et affiche des pertes de viabilité équivalente, respectivement, à 4.88, 3.76 et 3.81% dues à une diminution des vitesses d'inhibition respectives de 0.22, 0.16, 0.16 log UFC/h en présence de 10, 20 et 50 mg/mL (fig. 37 et 38B, tableaux 14 et 15).

La sensibilité de *Bacillus cereus* ATCC11778 se poursuit après 6h d'exposition des cellules aux extraits phénoliques affichant un pourcentage d'inhibition 5.01%, 2.04% et 13.15% (fig. 39A) équivalente à des vitesses d'inhibition voisines de 0.22, 0.08 et 0.55 log UFC/h en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube respectivement (tableau 14 et 15).

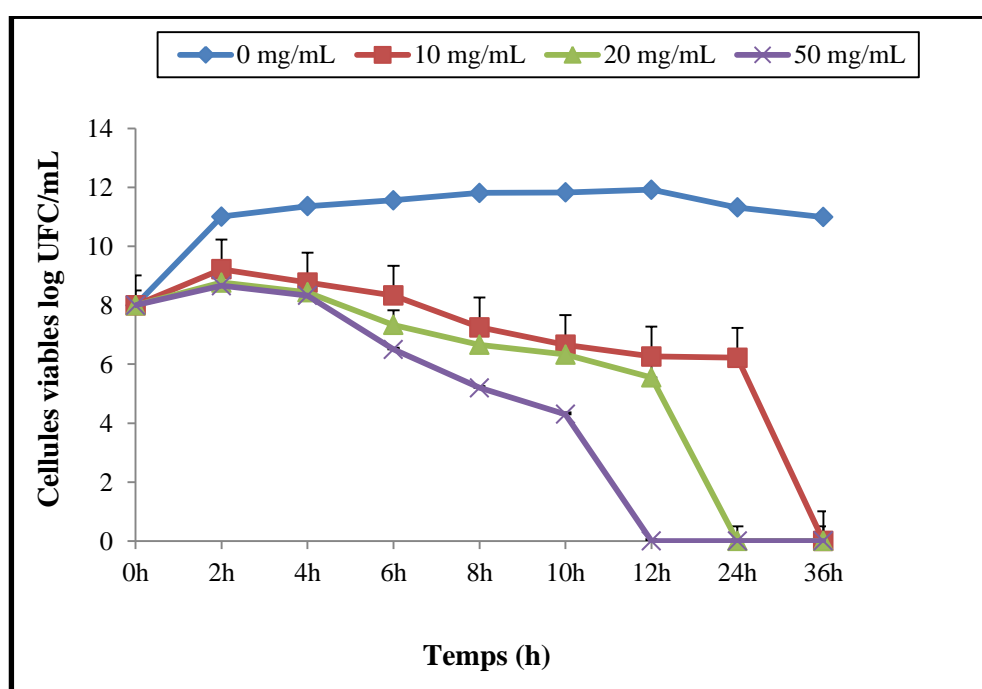
L'activité inhibitrice d'extrait phénolique de caroube vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC11778 s'accroît davantage entre la 6<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> heure de culture car on a, respectivement, enregistré des pertes en biomasse de l'ordre de 1.08 (soit -12.96%), 0.66 (soit -9.14%) et 1.32 (soit -20.01 %) log UFC/mL en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube avec des vitesses d'inhibition respectives de 0.54, 0.33 et 0.65 log UFC/h (fig. 39B, tableaux 14 et 15).

L'action inhibitrice d'extrait phénolique de caroube vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC11778 continue à chuter après 10h d'incubation car 0.59 (soit - 8.13%) et 0.33 (soit -4.13%) log UFC/mL de la biomasse enregistrée de culture en présence de 10 et 20 mg/mL avec des vitesses d'inhibition respectives de 0.28 et 0.17 log UFC/h (fig. 40A, tableaux 14 et 15).

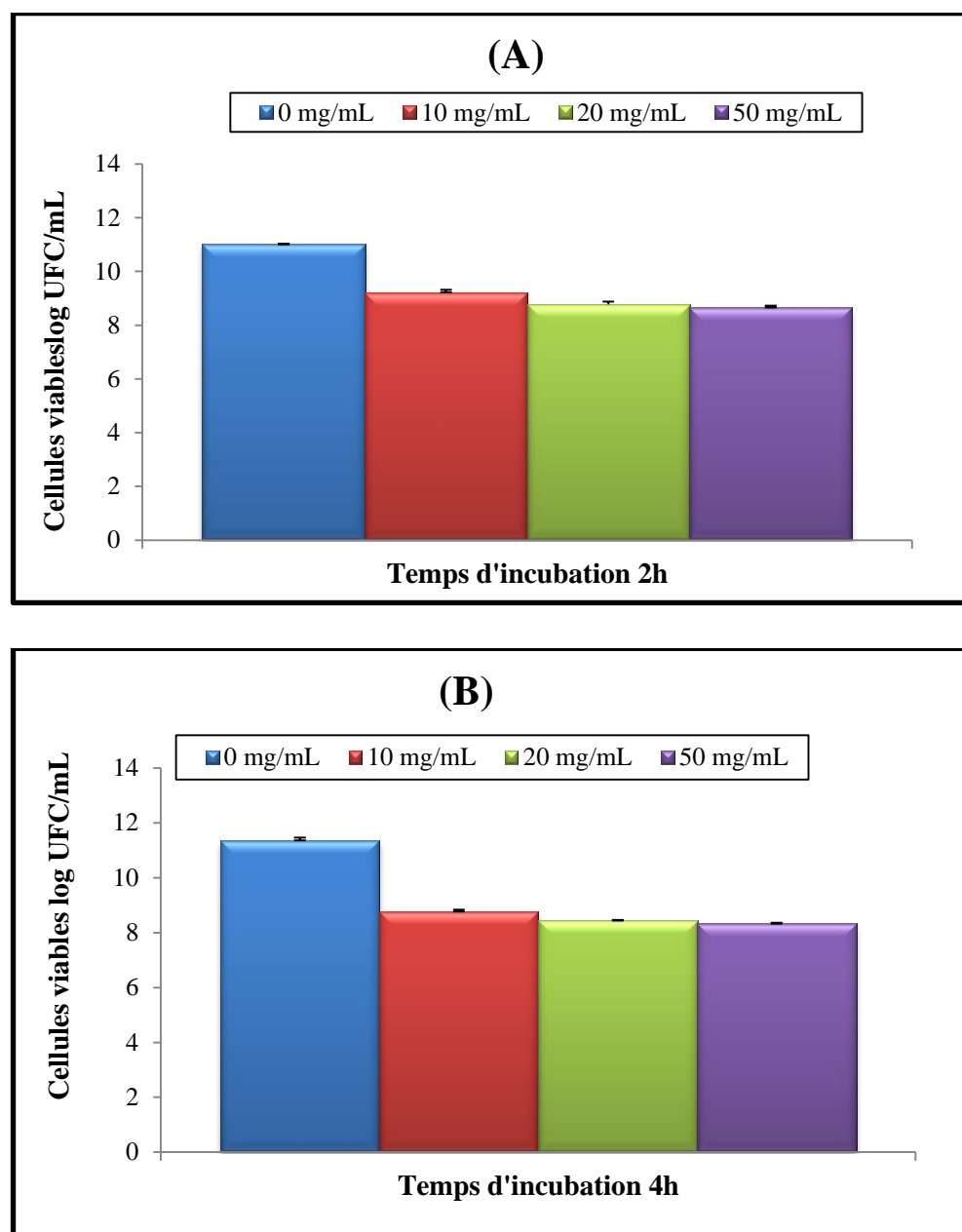
Cette inhibition était plus importante (plus de 80% de perte de viabilité) avec la plus forte concentration (50 mg/mL) où cette souche a été totalement inhibée (fig. 40A, tableau 14).

Cette sensibilité poursuit son augmentation si le temps de culture est prolongé à 12h et se manifeste par des inhibitions respectives de 0.6 et 12% en présence de 10 et 20 mg/mL (fig. 40B, tableau 14).

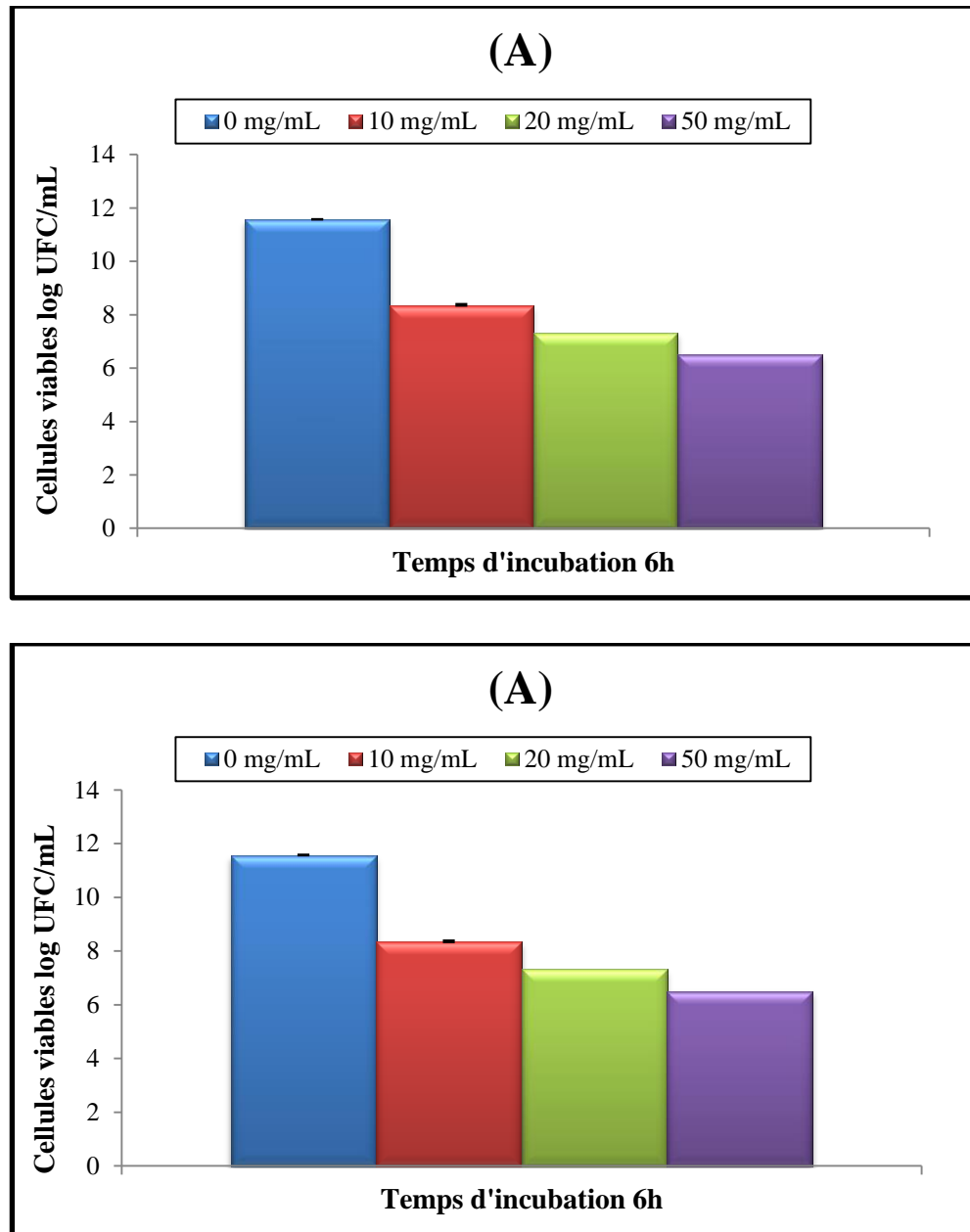
Après 24h de contact des cellules de *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec les polyphénols, l'action inhibitrice de 20 mg/mL d'extrait phénolique de caroube devient plus importante 87.77% (tableau 14). *Bacillus cereus* ATCC 11778 est totalement inhibée après 36h en présence de 10 mg/mL d'extrait phénolique des gousses de caroube (-99.36%).



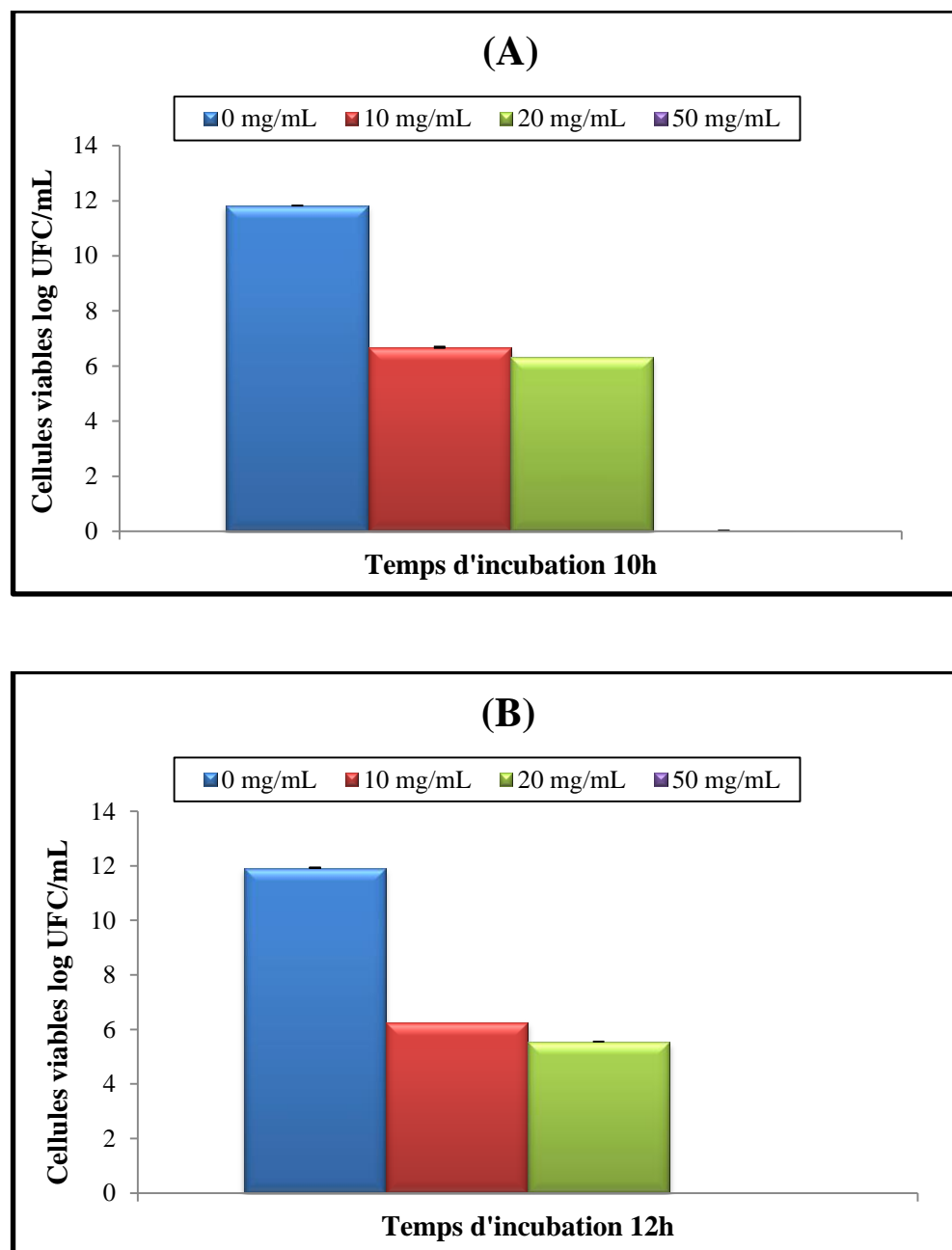
**Figure 37:** Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ATCC11778 en absence (0 mg/mL) et en présence de 10,20 et 50mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD (n=3).



**Figure 38:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 39:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extract phénolique aqueux de gousses de caroube pendant 6h (A) et 8h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 40:** Viabilité des cellules de *Bacillus cereus* ATCC11778 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de caroube pendant 10h (A) et 12h (B) de culture à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 14:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Bacillus cereus* ATCC11778 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+15.25 $\pm$ 0.29	+9.62 $\pm$ 0.34	+8.25 $\pm$ 0.59
<b>2h-4h</b>	-4.88 $\pm$ 0.14	-3.76 $\pm$ 0.10	-3.81 $\pm$ 0.14
<b>4h-6h</b>	-5.01 $\pm$ 0.17	-13.15 $\pm$ 0.71	-2.04 $\pm$ 0.17
<b>6h-8h</b>	-12.96 $\pm$ 0.48	-9.14 $\pm$ 0.84	-20.01 $\pm$ 0.90
<b>8h-10h</b>	-8.13 $\pm$ 0.31	-4.95 $\pm$ 0.46	-80.02 $\pm$ 1.86
<b>10h-12h</b>	-6.00 $\pm$ 0.94	-12.32 $\pm$ 0.54	00
<b>12h-24h</b>	-0.64 $\pm$ 0.02	-87.77 $\pm$ 1.14	00
<b>24h-36h</b>	-99.36 $\pm$ 1.36	00	00

**Tableau 15:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Bacillus cereus* ATCC11778 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.61 $\pm$ 0.17	+0.38 $\pm$ 0.02	+0.33 $\pm$ 0.20
<b>2h-4h</b>	-0.22 $\pm$ 0.04	-0.16 $\pm$ 0.01	-0.16 $\pm$ 0.09
<b>4h-6h</b>	-0.22 $\pm$ 0.07	-0.55 $\pm$ 0.07	-0.08 $\pm$ 0.09
<b>6h-8h</b>	-0.54 $\pm$ 0.08	-0.33 $\pm$ 0.06	-0.65 $\pm$ 0.07
<b>8h-10h</b>	-0.29 $\pm$ 0.01	-0.16 $\pm$ 0.02	-2.6 $\pm$ 0.06
<b>10h-12h</b>	-0.20 $\pm$ 0.03	-0.38 $\pm$ 0.02	-
<b>12h-24h</b>	-0.02 $\pm$ 0.004	-2.77 $\pm$ 0.07	-
<b>24h-36h</b>	-3.11 $\pm$ 0.23	-	-

### III.3.8. Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Durant les premières deux heures de culture, les différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube dans le milieu provoquent une augmentation de biomasse de l'ordre de 0.23 (+2.87%), 0.28 (+3.5%) et 0.22 (+2.75%) log UFC/mL générée par des vitesses de croissance respectives de 0.11, 0.14 et 0.11 log UFC/h en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique des gousses de caroube (fig. 41 et 42A, tableaux 16 et 17).

Lorsque l'incubation fut prolongée à 4h, la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 se poursuit en présence des différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube, affichant des pourcentages d'amélioration équivalents à 1.09, 2.29 et 1.70% en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube respectivement (fig.42B, tableau 16).

Après 6h de culture, cette souche persiste dans sa croissance qui surplombe celle du témoin en affichant des taux d'augmentation de la biomasse de l'ordre de 11.05, 6.13 et 1.67% en présence de 10, 20 et 50 mg/mL, respectivement (fig. 43A, tableau 16).

Cette dynamique de la croissance se maintient à la 8<sup>ème</sup> heure de culture où l'on continue d'observer une amélioration de la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 par rapport au témoin, avec différentes quantités de biomasse nouvellement accumulée de l'ordre de 0.04 (soit +0.54%), 0.18 (soit +2.11) et 0.36 (soit +4.12%) log UFC/mL (fig.43B, tableau 16) en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extraits phénoliques de caroube utilisés.

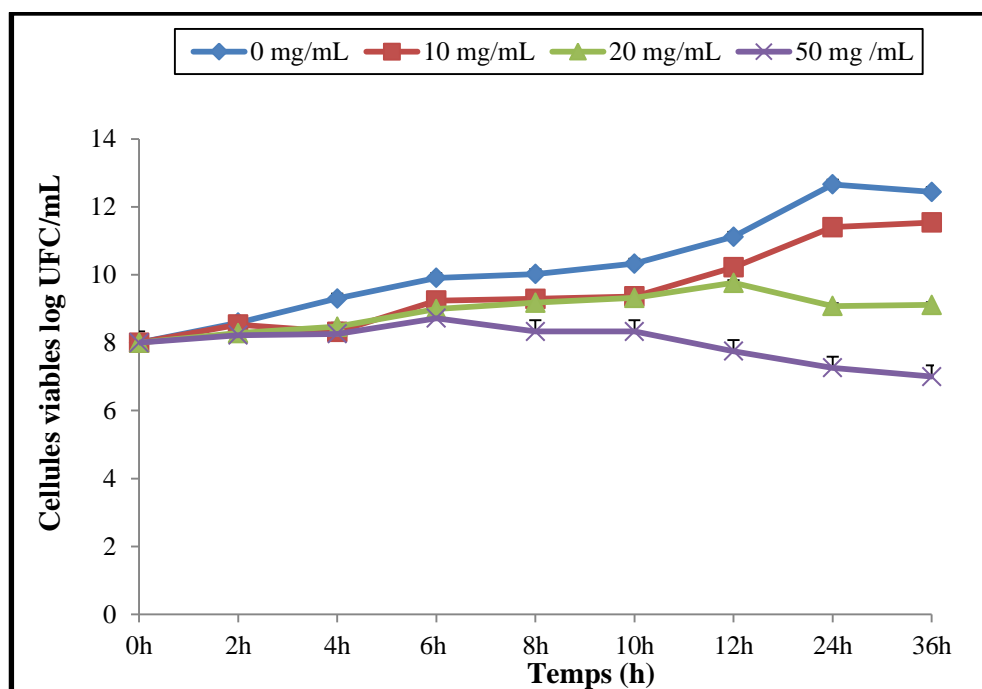
Une légère augmentation de biomasse de l'ordre de 0.75 et 1.52% a été observée après 10h de culture de *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec 10 et 20 mg/mL d'extrait phénolique de caroube correspondant à des vitesses de croissance respectives comprises entre 0.03 et 0.07 log UFC/h ; alors que l'on remarque une certaine stabilité de cette croissance de cette même souche en présence de 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube (fig. 44A tableaux 16 et 17).

La croissance de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 continue à être stimulée dans l'intervalle d'incubation 10-12h, car la biomasse augmente de 0.86 (soit +9.18 %) et de 0.22 (soit +4.72 %) log UFC/mL en présence de 10 et 20 mg/mL par rapport au témoin. En revanche, une perte de biomasse de l'ordre 0.58 log UFC/mL (soit -6.96%) a été enregistrée en présence de 50 mg/mL; ce qui correspond une vitesse d'inhibition de 0.29 log UFC/h (fig.44B, tableaux 16 et 17).

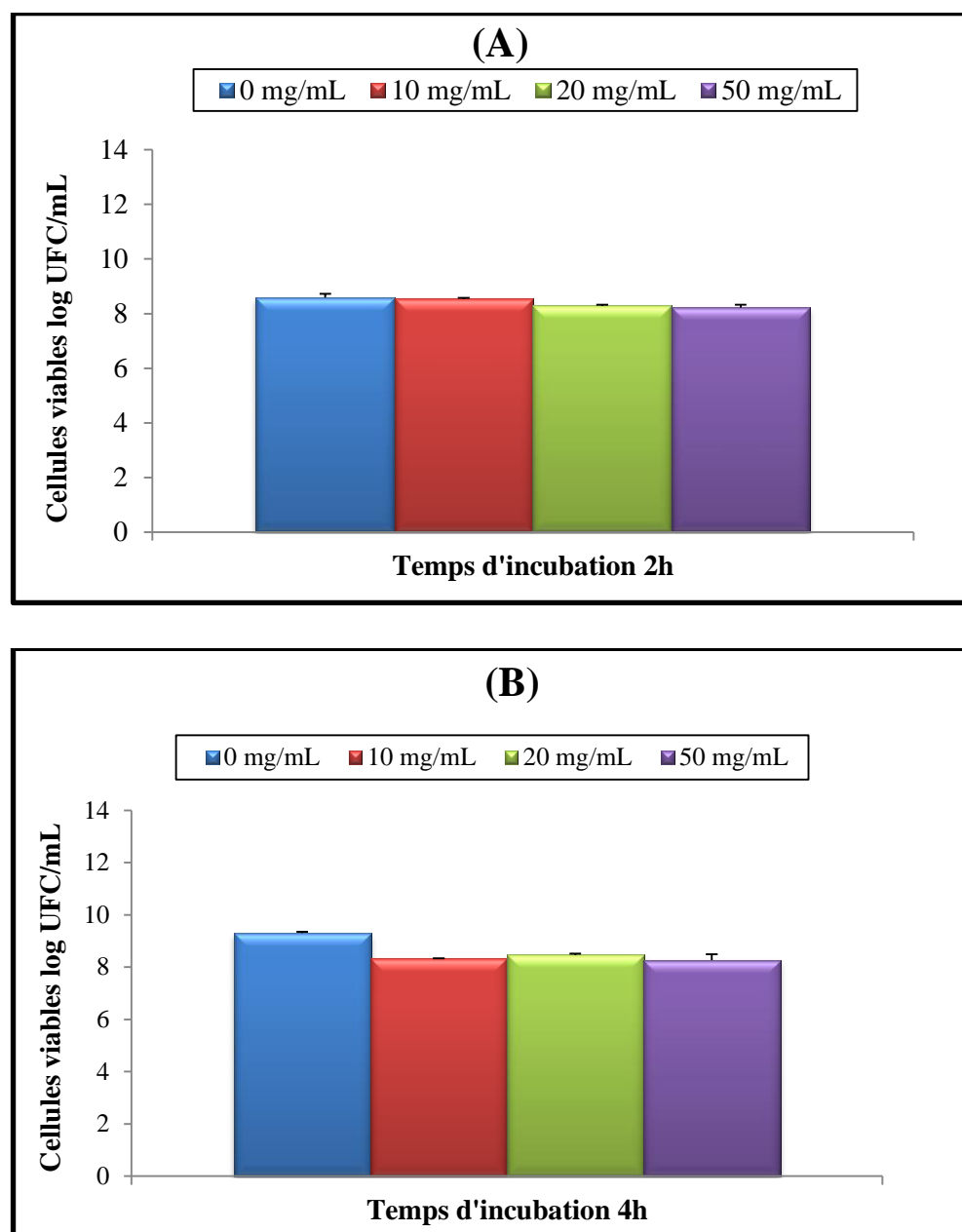
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 reste insensible à la concentration en polyphénols de

10 mg/mL car cette bactérie poursuit sa croissance dans l'intervalle d'incubation 12-24h (+0.11 log UFC/mL) et même celui d'entre 24 et 36h (+1.22 %). Pendant ce même intervalle 12-24h et à 20 mg/mL d'extrait, cette bactérie commence à être inhibée à un taux de -6.96% (soit -0.68 log UFC/mL); alors qu'à 50 mg/mL d'extrait, l'inhibition entamée auparavant se maintient au taux de -0.14% (fig.45A, tableau 16).

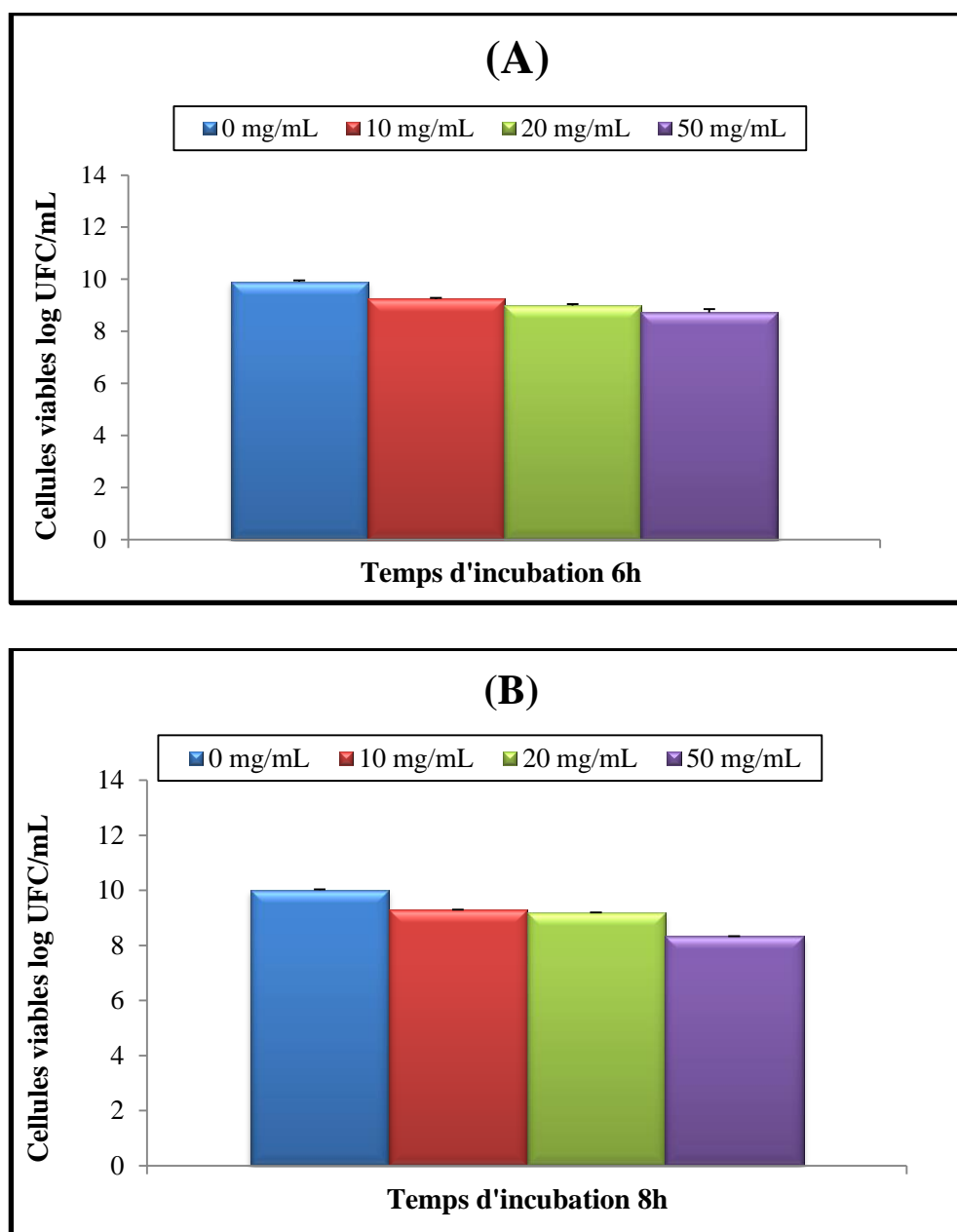
Par contre, entre la 24 et la 36<sup>ème</sup> heure d'incubation, les pertes en viabilité s'arrêtent en présence de 20 mg/mL, et se poursuivent à 50 mg/mL au taux de - 3.58% (fig. 41, 45B, tableaux 16 et 17).



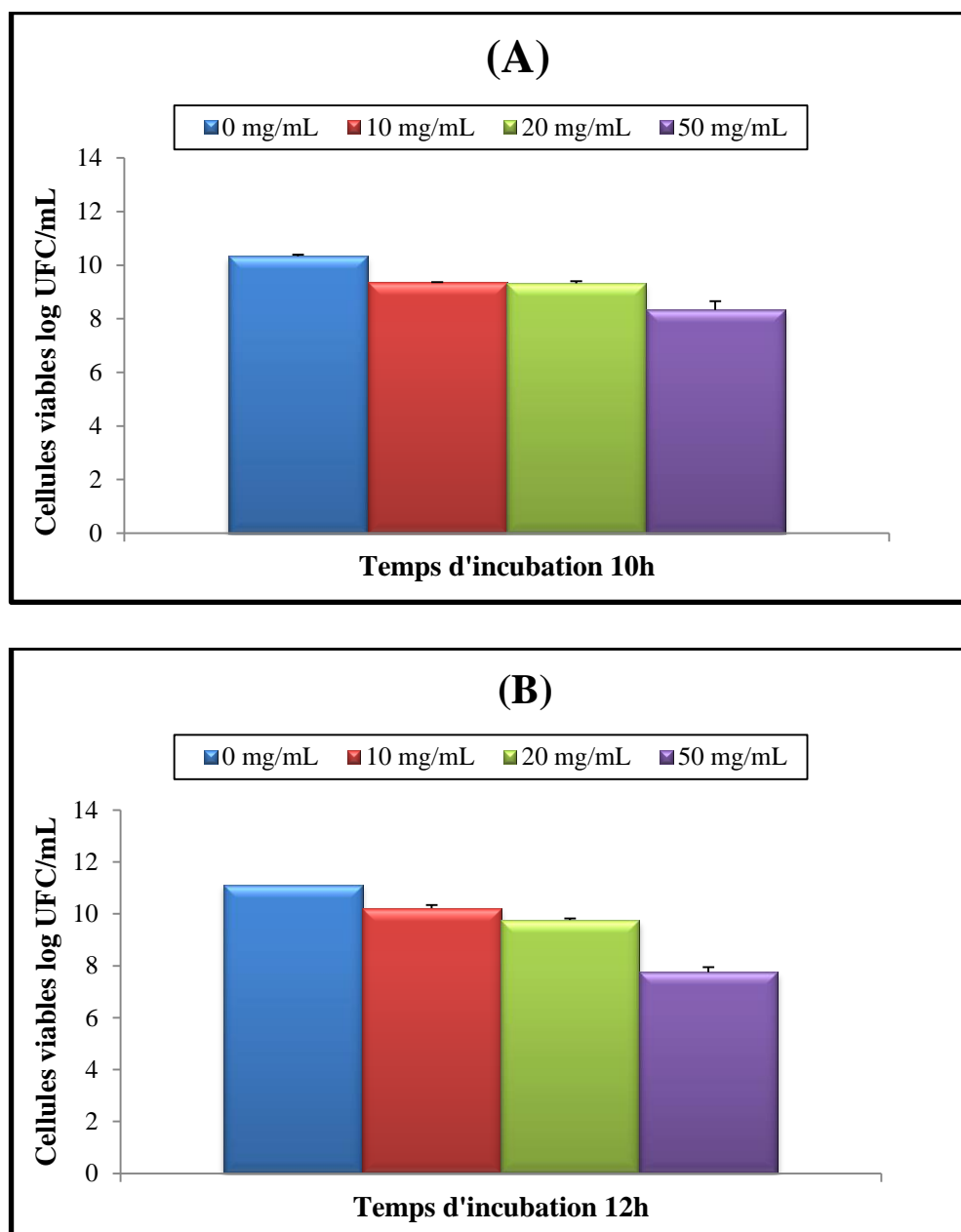
**Figure 41:** Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ±SD.



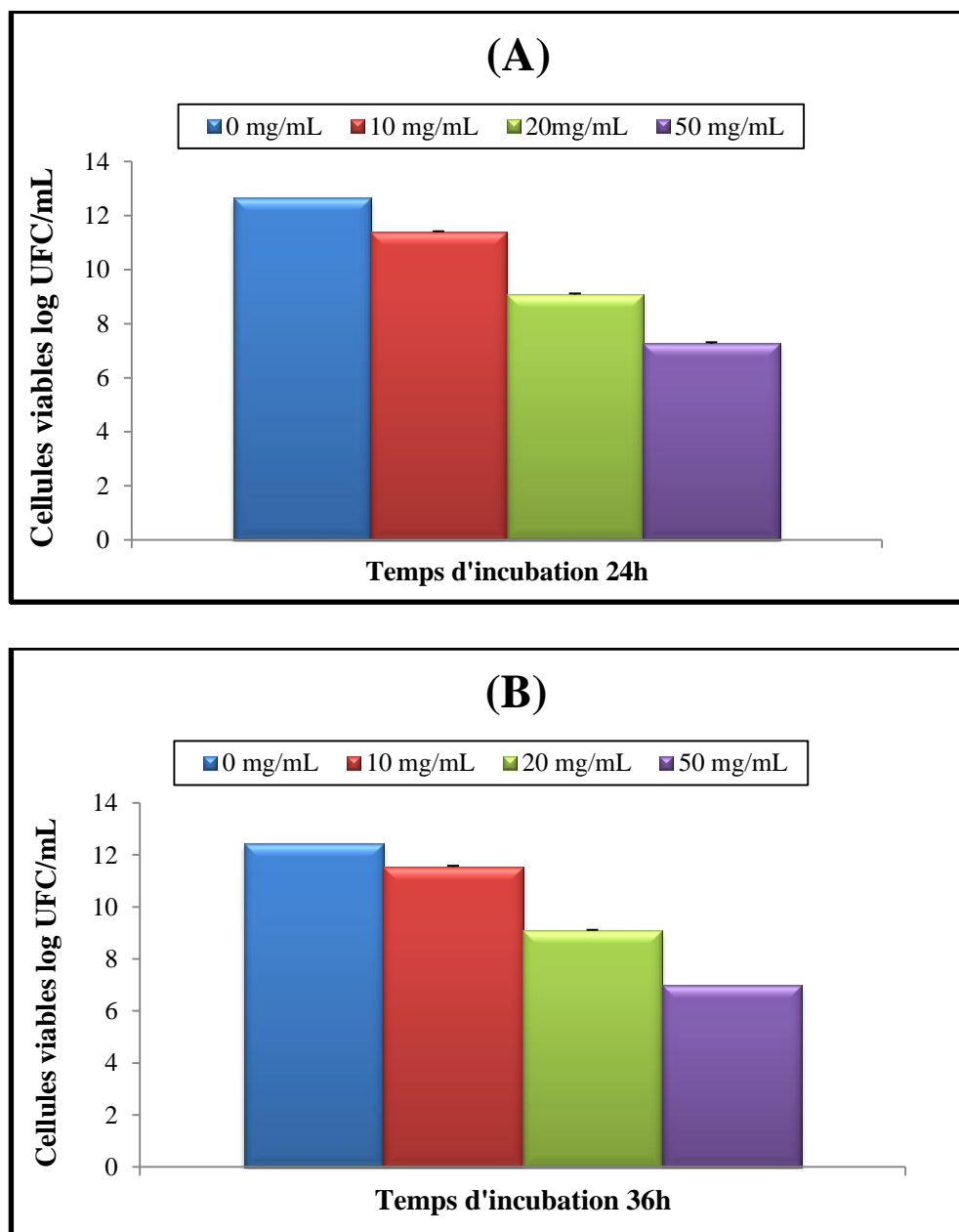
**Figure 42:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **2h (A)** et **4h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 43:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A) et 8h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 44:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A)** et **12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 45:** Viabilité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extract phénolique de caroube pendant **24h (A)** et **36h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

Biyiti et al. (2004) ont testé l'effet antibactérien in vitro des extraits hydro-éthanoliques de *Cissus petiolata*, *Harrissonia abyssinica*; *Maesopsis eminii* et *Pyrenacantha staudtii* sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont constaté que les extraits des quatre plantes se sont révélés actifs sur une ou plusieurs bactéries. L'extrait de *P. staudtii* a été le plus actif en générant des diamètres de zones d'inhibition de croissance de 11; 14; 6 et 15 mm sur *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement.

*P. staudtii* et *H. abyssinica* ont montré des effets bactéricides aussi bien sur *P. aeruginosa*; à 4,68 et 9,37 mg/mL, que sur *S. aureus* à 9,37 et 18,75 mg/mL respectivement. *P. staudtii* a présenté la plus grande activité antibactérienne. Cette importante activité s'est manifestée sur *P. aeruginosa* avec une CMI de 2,34 mg/mL.

Sudjana et al. (2009) ont testé un extrait aqueux de feuilles d'olivier contre 122 espèces microbiennes. Ils ont constaté que cet extrait a exercé un effet antimicrobien trop restreint, car, parmi l'ensemble des microorganismes testés, il s'est avéré qu'uniquement *C. jejuni*, *Helicobacter pylori* et *S. aureus* avaient manifesté une certaine sensibilité envers cet extrait. Les valeurs de CMI enregistrées étaient comprises entre 0.31 et 0.78 mg/mL pour ces trois souches bactériennes. Cependant, pour le reste des microorganismes, entre autres *P. aeruginosa*, leurs CMI sont situées entre 6.25 et 50 mg/mL.

Djenane et al. (2012) ont analysé l'extrait brut phénolique de feuilles d'olivier pour leur activité antimicrobienne et leur application dans la conservation de viande fraîche de dinde. Ils ont noté que l'extrait polyphénolique exerce un effet antibactérien significatif ( $p < 0,05$ ) vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. enteritidis*. Cet effet est constaté dès le 1er jour de stockage de la viande.

En effet, une réduction de 2.23 (avec 30.38 mg/mL d'extrait) et 1.56 log (avec 21,56 mg/mL d'extrait) est enregistrée au dernier jour de stockage. Quant à l'extrait brut, il est important, également, de signaler son activité antimicrobienne modérée vis-à-vis de ces deux bactéries, car il engendre une réduction de 1.5 et 0.47 log UFC/g au dernier jour de stockage respectivement contre *P. aeruginosa* et *S. Enteritidis*.

**Tableau 16 :** Cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+2.87 $\pm$ 0.29	+3.5 $\pm$ 0.34	+2.75 $\pm$ 0.19
<b>2h-4h</b>	+1.09 $\pm$ 0.05	+2.29 $\pm$ 0.31	+1.70 $\pm$ 0.05
<b>4h-6h</b>	+11.05 $\pm$ 0.24	+6.13 $\pm$ 0.71	+1.67 $\pm$ 0.11
<b>6h-8h</b>	+0.54 $\pm$ 0.01	+2.11 $\pm$ 0.12	+4.12 $\pm$ 0.27
<b>8h-10h</b>	+0.75 $\pm$ 0.02	+1.52 $\pm$ 0.10	-0.61 $\pm$ 0.03
<b>10h-12h</b>	+9.18 $\pm$ 0.94	+4.72 $\pm$ 0.24	-6.96 $\pm$ 0.15
<b>12h-24h</b>	+0.11 $\pm$ 0.03	-6.96 $\pm$ 0.14	-0.14 $\pm$ 0.01
<b>24h-36h</b>	+1.22 $\pm$ 0.04	-	-3.58 $\pm$ 0.10

**Tableau 17:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées/h) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.11 $\pm$ 0.009	+0.14 $\pm$ 0.05	+0.11 $\pm$ 0.03
<b>2h-4h</b>	+0.04 $\pm$ 0.001	+0.09 $\pm$ 0.002	+0.07 $\pm$ 0.006
<b>4h-6h</b>	+0.46 $\pm$ 0.07	+0.26 $\pm$ 0.009	+0.07 $\pm$ 0.008
<b>6h-8h</b>	+0.02 $\pm$ 0.002	+0.09 $\pm$ 0.002	+0.18 $\pm$ 0.07
<b>8h-10h</b>	+0.03 $\pm$ 0.004	+0.07 $\pm$ 0.004	-0.11 $\pm$ 0.02
<b>10h-12h</b>	+0.43 $\pm$ 0.05	+0.22 $\pm$ 0.01	-0.29 $\pm$ 0.05
<b>12h-24h</b>	+0.59 $\pm$ 0.08	-0.34 $\pm$ 0.06	-0.04 $\pm$ 0.01
<b>24h-36h</b>	+0.07 $\pm$ 0.003	+0.01 $\pm$ 0.004	-0.23 $\pm$ 0.02

### III.9. Cinétique de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS

Durant les premières deux heures de culture, l'addition des différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube provoque une augmentation de biomasse affichant des taux d'amélioration de 27.5, 7.12 et 4.12 générés par des vitesses de croissance respectives de 1.11, 0.28 et 0.16 log UFC/h en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de gousses de caroube ( fig. 46 et 47A, tableaux 18 et 19).

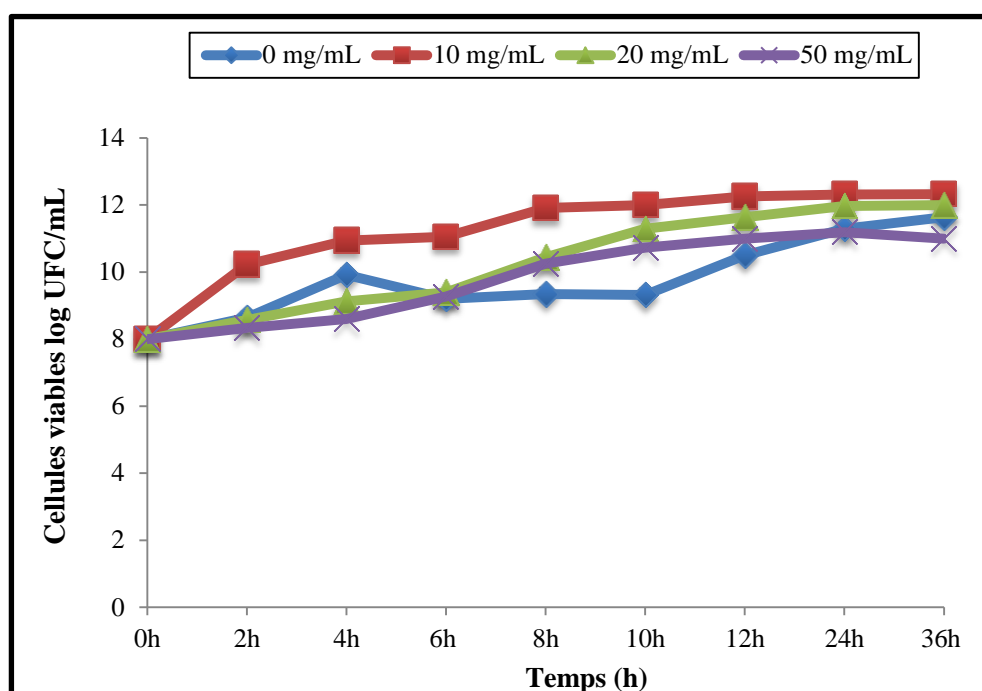
Lorsque l'incubation fut prolongée à 4h, l'évolution de la croissance de LbRE-LSAS continue en présence des différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube, qui affiche des biomasses de 0.76, 0.56 et 0.32 log UFC/mL en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extrait phénolique des gousses de caroube; ce qui correspond à des améliorations respectives de l'ordre de 7.05, 6.53 et 3.96 % (fig. 47B, tableau 18).

Au bout de 6h d'incubation (fig. 48A), l'écart de croissance entre le témoin et les milieux additionnés d'extrait de polyphénols de caroube s'affirme encore un peu plus puisque on remarque que la biomasse *Lactobacillus rhamnosus* augmente à des taux équivalents à 1, 2.8 et 7.79% en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénoliques de caroube, respectivement.

La tendance à l'amélioration de la biomasse de cette souche bénéfique est maintenue après 8h de culture, étant donné que par rapport au témoin, sa biomasse augmente de 0.86 (7.78%), 1.05 (11.18%) et 0.98 (10.57%) log UFC/mL (fig. 48B, tableau 18) en présence de différentes concentrations d'extrait phénoliques de caroube utilisé.

Une augmentation de biomasse correspondante à des vitesses de croissance de l'ordre de 0.04, 0.42 et 0.24 log UFC/h a été observée après 10h de culture de LbRE-LSAS avec 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube respectivement (fig. 49A) (tableau 18).

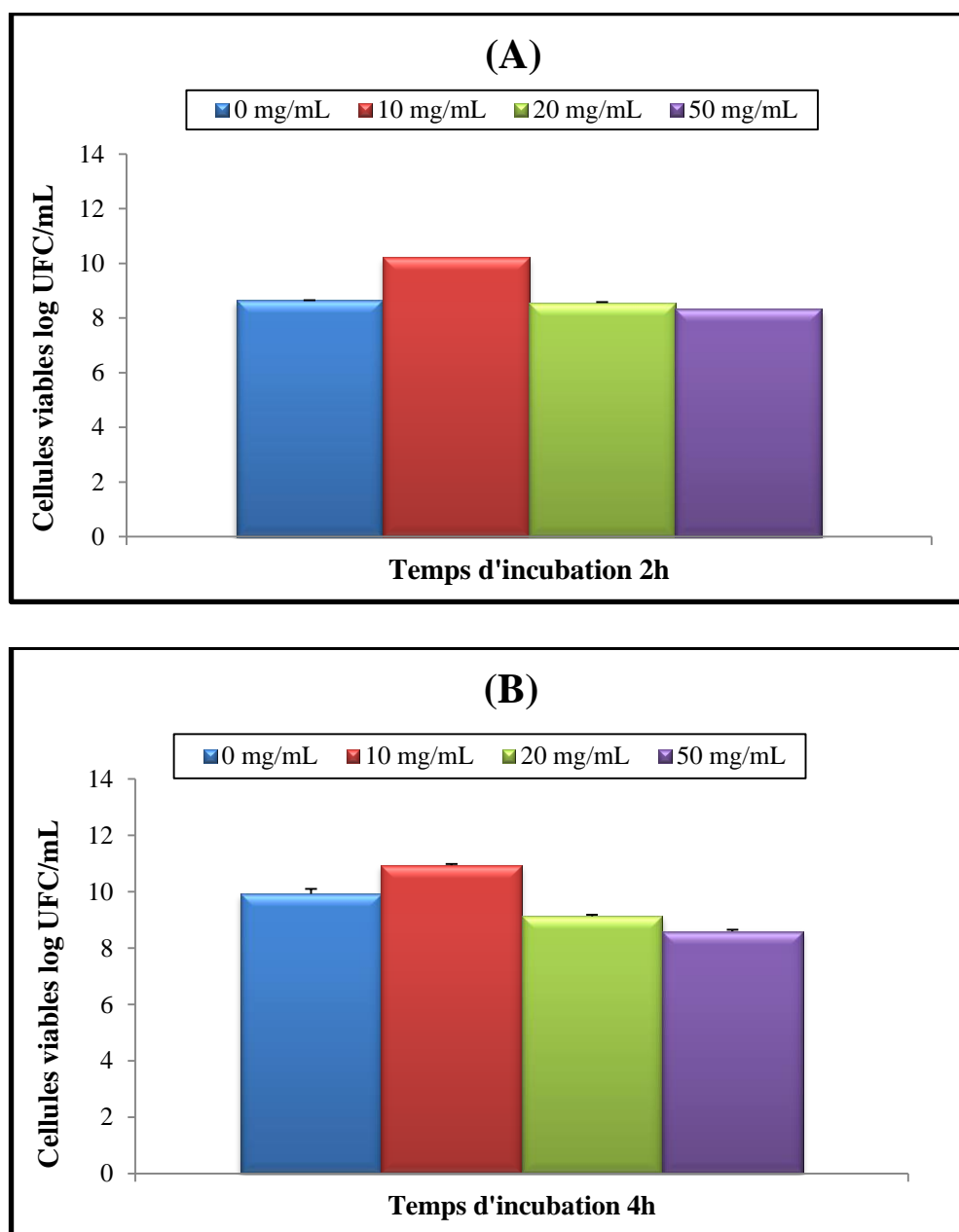
Cette évolution de la croissance poursuit son augmentation après 12h de culture de la souche LbRE-LSAS qui affiche des pourcentages d'amélioration de 2.16, 3.4 et 2.51% en présence de 10, 20 et 50 mg /mL respectivement (fig. 49B). La souche *Lactobacillus rhamnosus* persiste dans sa croissance après 24h de culture en présence d'extrait phénolique de caroube (10, 20 et 50 mg/mL) en affichant des augmentations de biomasse comprises entre 0.05 et 0.32 log UFC/mL générées par des vitesses de croissance variables de 0.05 à 0.33 log UFC/mL (fig. 50A, tableau19).



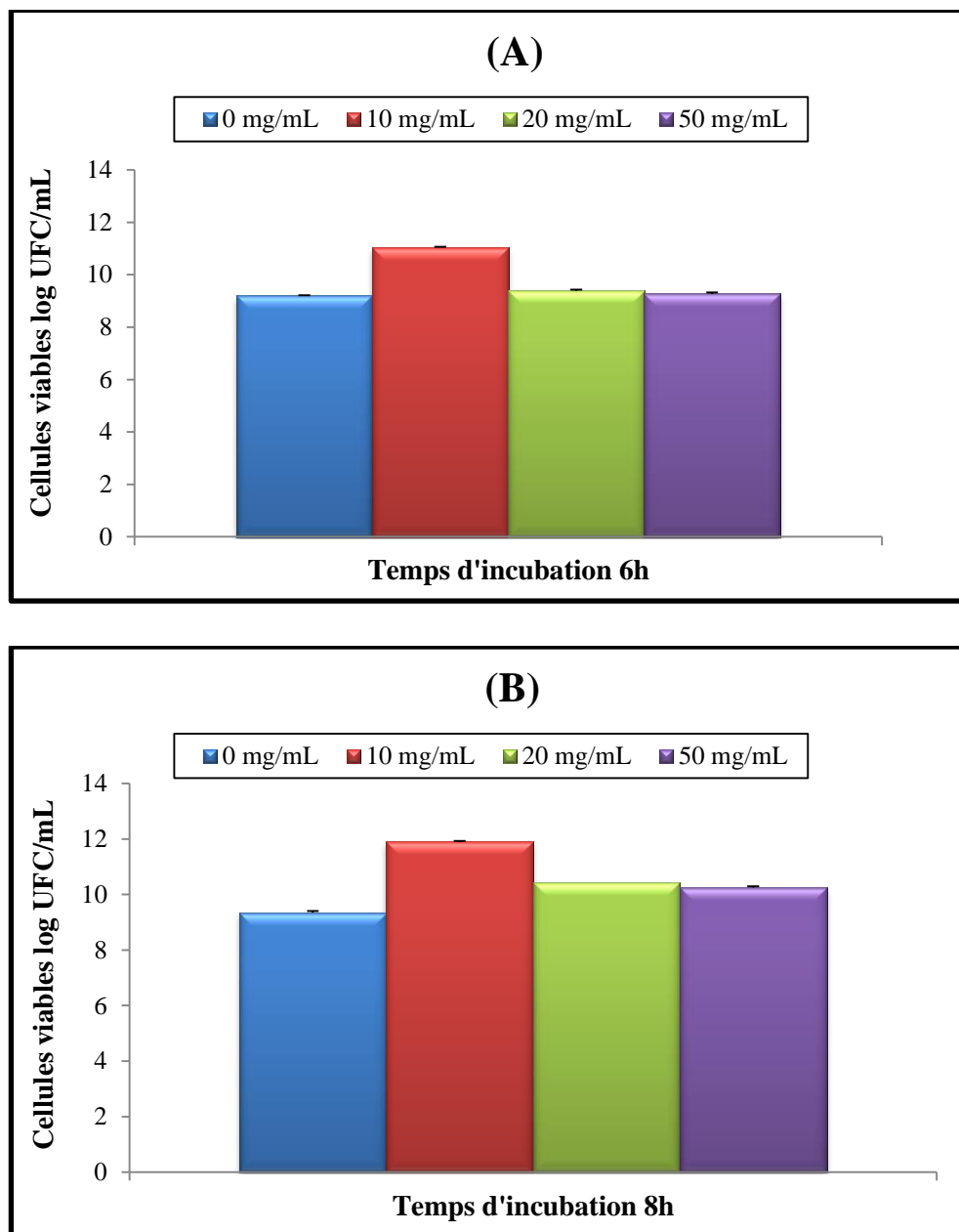
**Figure 46:** Cinétique de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10,20 et 50 mg/mL d'extrait aqueux caroube durant 36h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

Sutherland et al. (2009) ont analysés l'extrait des fruits, des légumes, des céréales, des herbes et des épices, dont la plupart sont communes dans un régime alimentaire normal de style européen en utilisant différentes solvant. L'impact de ces extraits sur la croissance des bactéries probiotiques sélectionnées (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *bifidobactéria lactis*) et des bactéries pathogènes (*Escherichia coli* 0157: H7 et *Escherichia coli* LF82) a été évaluée à l'aide d'une méthode de concentration minimale inhibitrice standard.

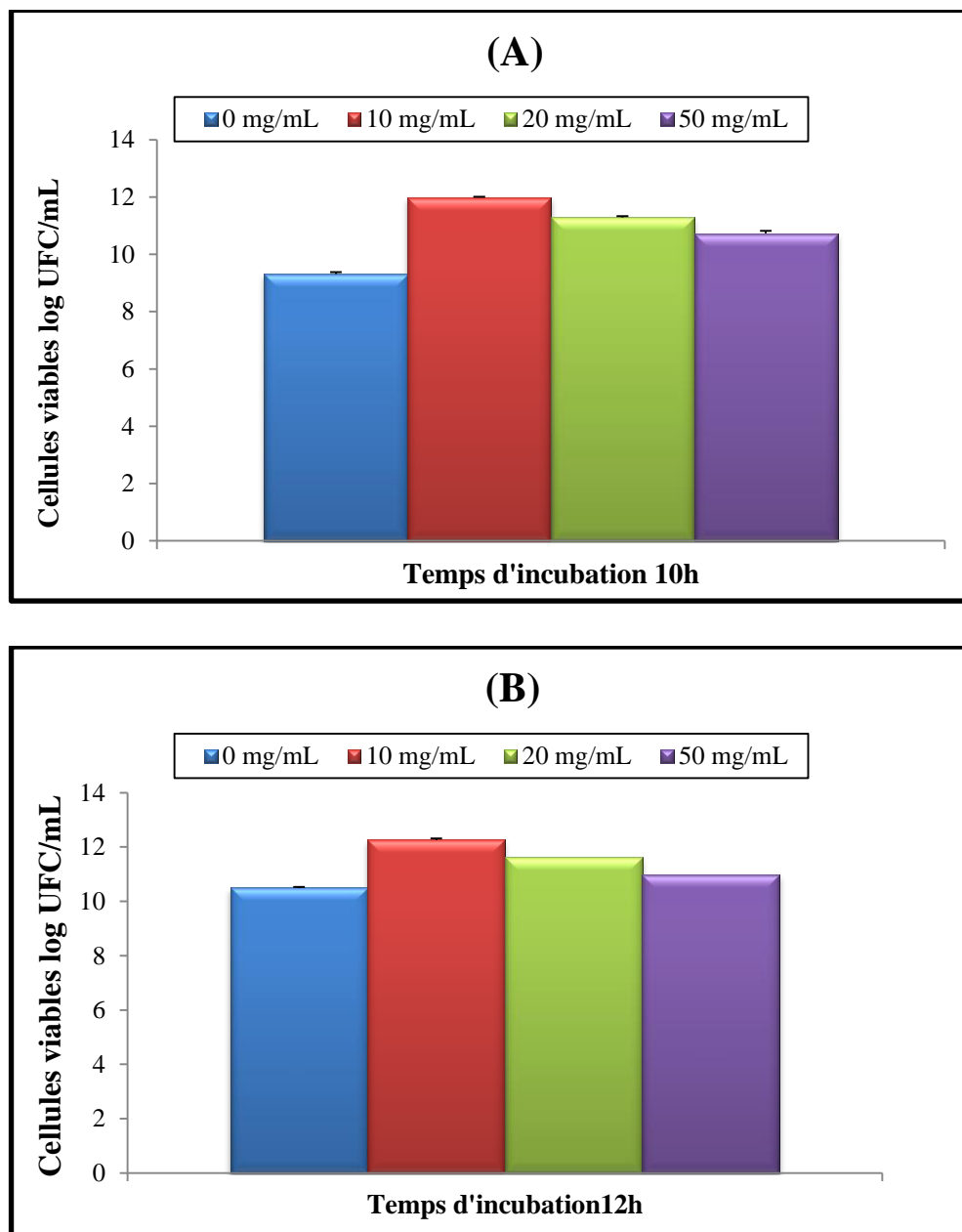
Les résultats ont montré que les extractions aqueuses d'ail et de poivre noir ont significativement amélioré la croissance de *L. reuteri*, tandis que l'inhibition des deux souches pathogènes de *E. coli* à une dilution 1:50. Des extraits aqueux de banane, pomme et orange tout amélioré la croissance des trois souches probiotiques de manière significative, et inhibé les agents pathogènes à environ 80 % des témoins.



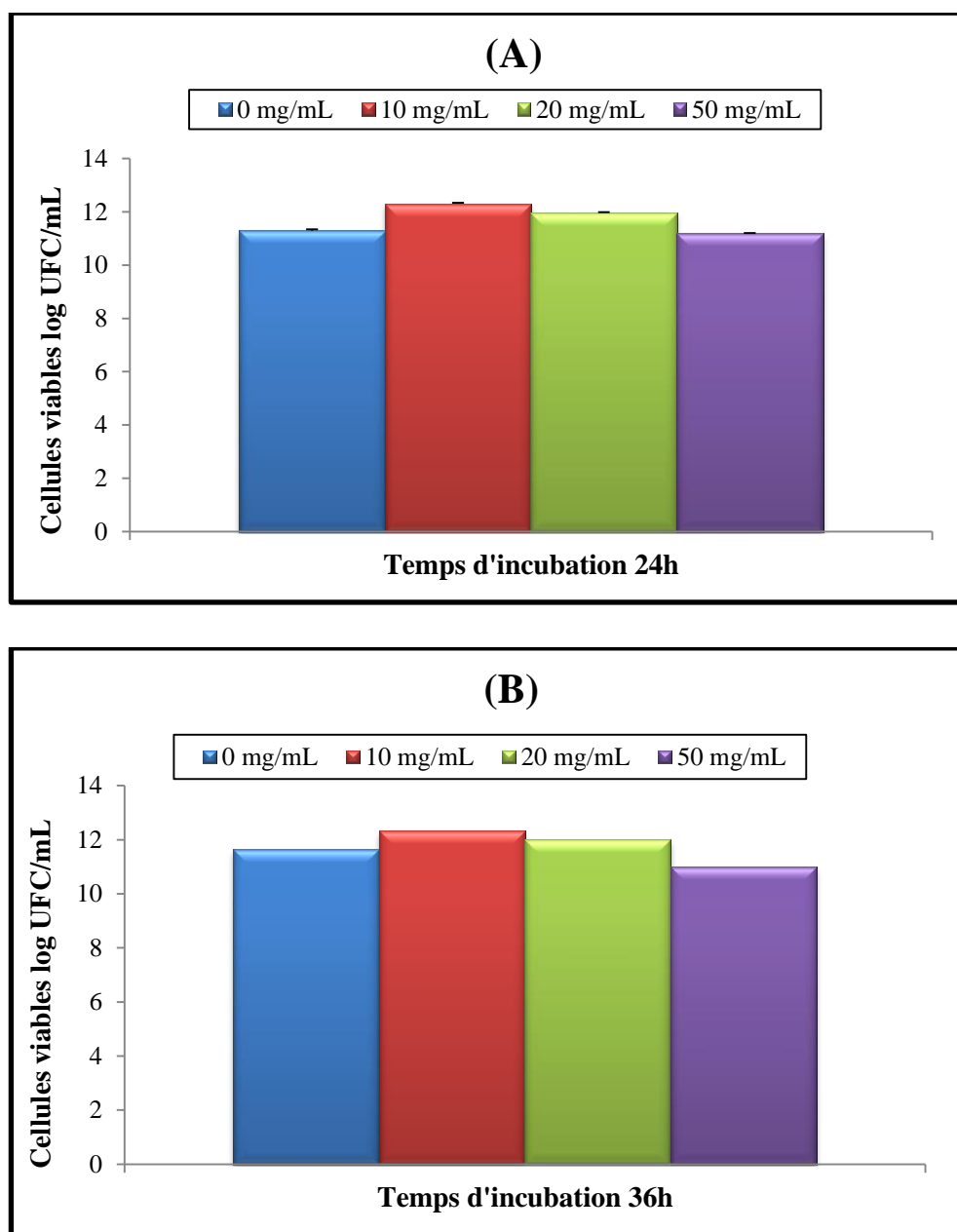
**Figure 47:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant 2h (A) et 4h (B) de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 48:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (Log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) et en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A)** et **8h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 49:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A) et 12h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD (n=3).



**Figure 50:** Viabilité des cellules de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (log UFC/mL) en présence de différentes concentrations d'extrait phénolique de caroube pendant **24h (A)** et **36h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

**Tableau 18:** La cinétique d'amélioration (exprimée en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
0-2h	+27.50 $\pm$ 0.42	+7.12 $\pm$ 0.45	+4.12 $\pm$ 0.26
2h-4h	+7.05 $\pm$ 0.31	+6.53 $\pm$ 0.41	+3.96 $\pm$ 0.28
4h-6h	+1.00 $\pm$ 0.05	+2.84 $\pm$ 0.35	+7.79 $\pm$ 0.18
6h-8h	+7.78 $\pm$ 0.26	+11.18 $\pm$ 0.13	+10.57 $\pm$ 0.15
8h-10h	+0.75 $\pm$ 0.02	+8.14 $\pm$ 0.12	+4.68 $\pm$ 0.08
10h-12h	+2.16 $\pm$ 0.09	+3.40 $\pm$ 0.14	+2.51 $\pm$ 0.01
12h-24h	+0.40 $\pm$ 0.02	+2.83 $\pm$ 0.11	+1.72 $\pm$ 0.02
24h-36h	-	+0.25 $\pm$ 0.01	-1.69 $\pm$ 0.03

**Tableau 19:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées/h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
0-2h	+1.11 $\pm$ 0.12	+0.28 $\pm$ 0.03	+0.16 $\pm$ 0.02
2h-4h	+0.36 $\pm$ 0.02	+0.28 $\pm$ 0.01	+0.16 $\pm$ 0.01
4h-6h	+0.06 $\pm$ 0.005	+0.13 $\pm$ 0.02	+0.32 $\pm$ 0.03
6h-8h	+0.43 $\pm$ 0.06	+0.52 $\pm$ 0.04	+0.49 $\pm$ 0.01
8h-10h	+0.04 $\pm$ 0.002	+0.42 $\pm$ 0.06	+0.24 $\pm$ 0.03
10h-12h	+0.13 $\pm$ 0.01	+0.17 $\pm$ 0.005	+0.13 $\pm$ 0.02
12h-24h	+0.02 $\pm$ 0.001	+0.16 $\pm$ 0.04	+0.09 $\pm$ 0.001
24h-36h	-	+0.001 $\pm$ 00	-0.09 $\pm$ 0.002

### III.3.10. La Cinétique de croissance de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb12

Le comportement de la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) vis-à-vis des différentes concentrations d'extrait phénoliques des gousses de caroube est illustré par la figure 51.

En effet, cette figure montre que la viabilité des cellules de Bb12 n'est pas affectée par les différentes concentrations après 2 h d'incubation et, qu'au contraire, elle est plutôt améliorée de 1.24 (+15.5%), 0.62 (+7.75%) et 0.18 (+2.25%) log UFC/mL en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube, respectivement; cette amélioration a été générée par des vitesses de croissance respectives de l'ordre de 0.62, 0.32 et 0.09 log UFC/h (fig. 52A, tableaux 20 et 21).

Après 4h de culture, la croissance de Bb12 est améliorée de 0.39 (soit +4.22%), 0.19 (soit 2.08%) et de 0.15 log UFC/mL (soit 1.83%) par la présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube; ce qui correspond à des vitesses de croissance de 0.19, 0.09 et 0.07 log UFC/h (fig. 52B, tableaux 20 et 21).

La stimulation de la croissance de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* par les polyphénols se poursuit après 6h de culture. Sa viabilité se trouve améliorée par rapport au témoin de 6.43, 3.4 et 3.72% en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube avec des vitesses de croissance respectives correspondantes voisines de 0.31, 0.07 et 0.16 log UFC/h (fig. 53A, tableaux 20 et 21). La prolongation de cette culture à 8h (fig. 53B) donne une forte augmentation de biomasse en présence de 10 mg/mL d'extrait phénolique de la gousse de caroube, soit 17.57%. En revanche, en présence de 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube, cette augmentation de biomasse persiste mais d'une intensité plus faible, soit 0.1 et 6%, respectivement (tableau 20).

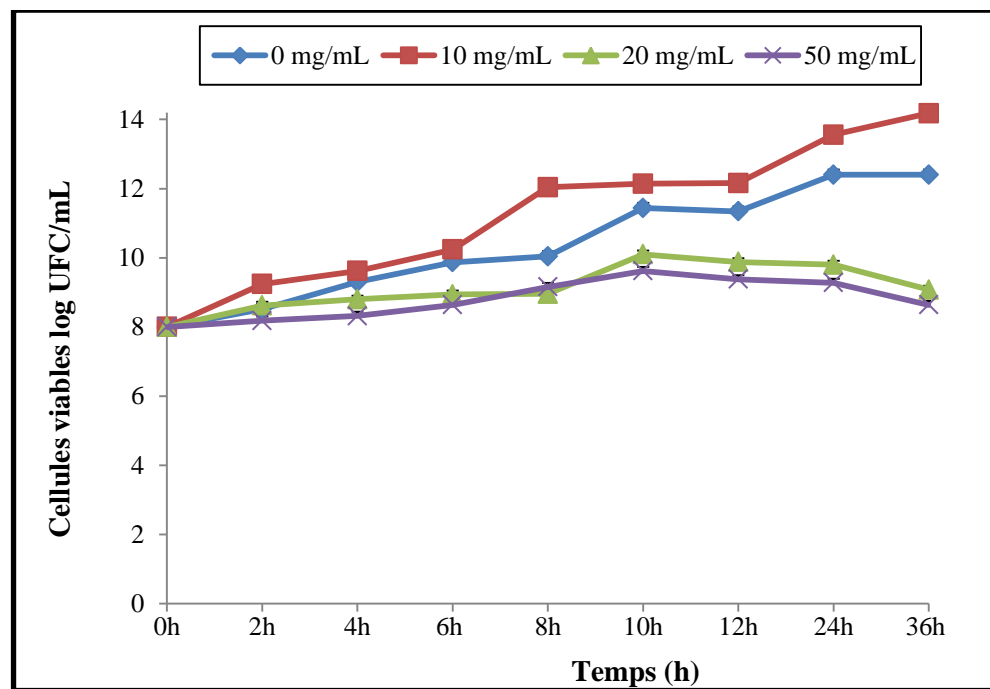
*Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* semble s'accommoder avec le temps à la présence de polyphénols de caroube dans son milieu de culture puisqu'après 10h d'exposition, on enregistre par rapport au témoin 0.88, 11.20 et 5.13% d'augmentation de sa biomasse en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube, respectivement (fig. 54A).

Lorsque cette culture est prolongée à 12h, les concentrations 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube retardent quelque peu la croissance de *Bifidobacterium animalis* subsp.

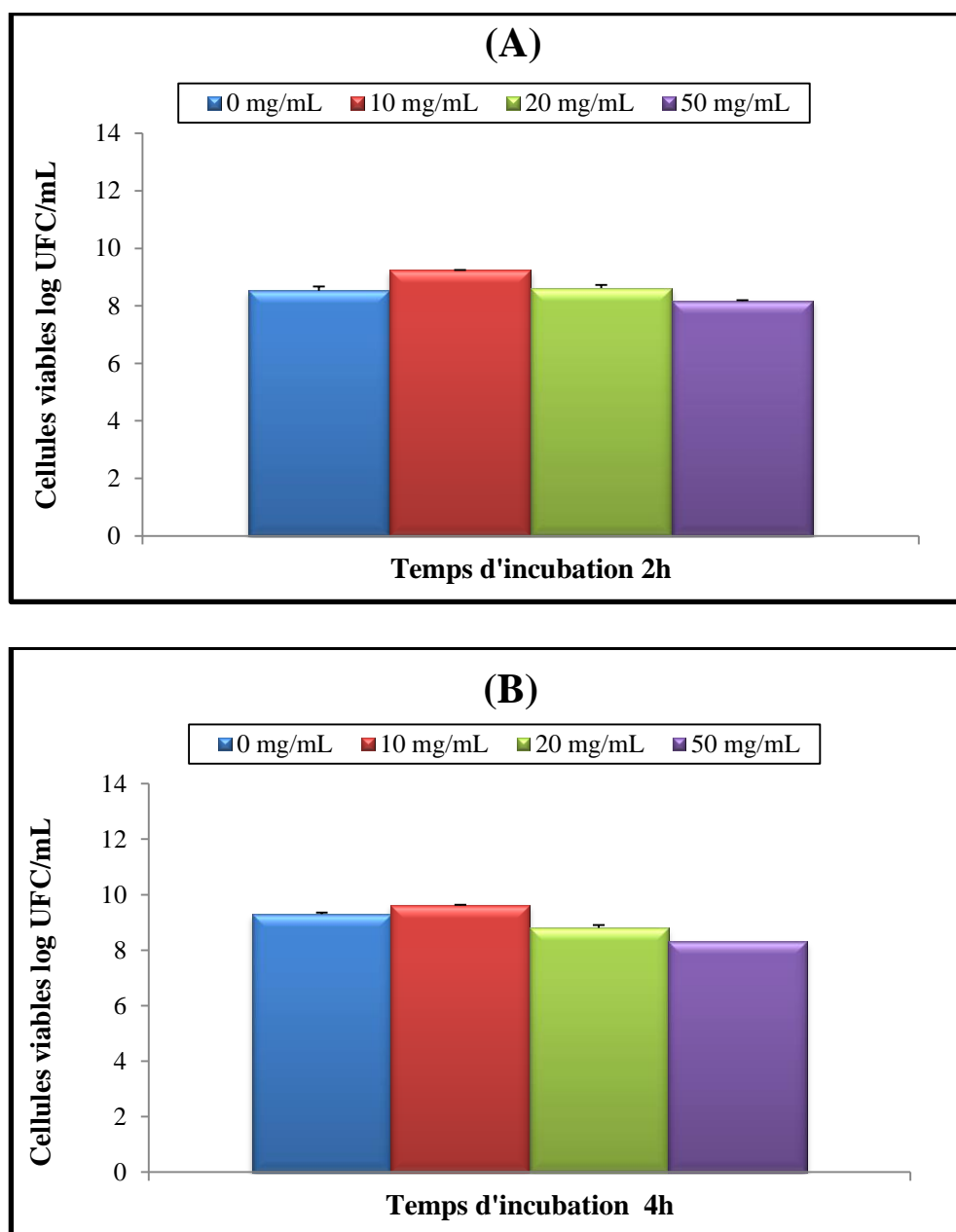
*Lactis* Bb12 dont la biomasse régresse à un niveau de l'ordre -2.29% et -2.49% respectivement; alors qu'à 10 mg/mL d'extrait phénolique, cette croissance de Bb12 continue d'être améliorée de 0.62 log UFC/mL (soit de 0.17%) (fig. 54B, tableau 20).

La croissance de cette souche se maintient au bout de 24h de culture en présence de 10 mg/mL d'extrait phénolique de caroube dans le milieu et s'écarte de 12.22% de celle du témoin (fig.55A).

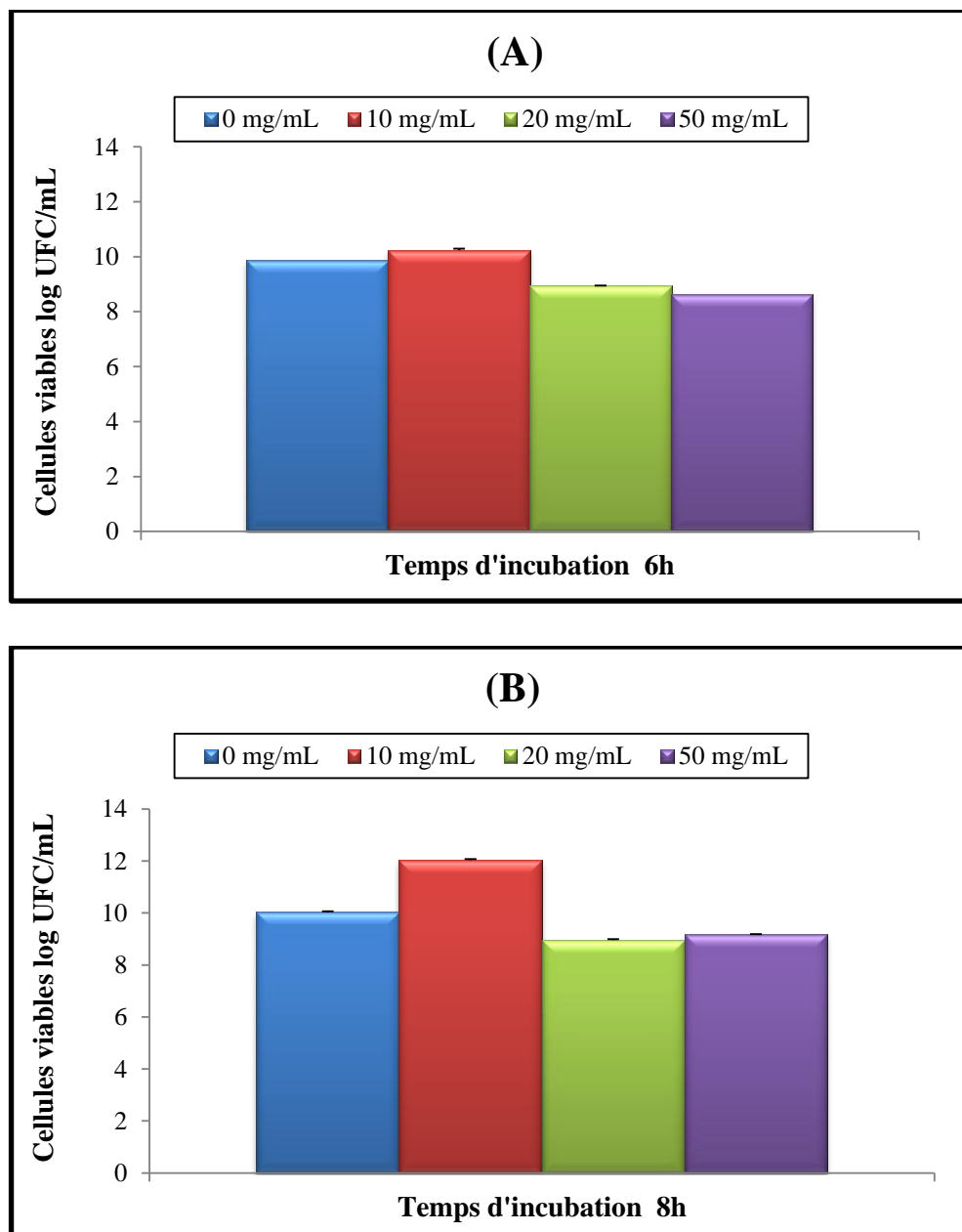
En revanche, il y a perte de viabilité de la Bb12 au bout de 24h de culture en présence de 20 (- 0.08 log UFC/mL) et 50 mg/mL (- 0.10 log UFC/mL); ce qui correspond à des vitesses d'inhibition respectives de 0.04 (- 0.8%) et 0.05 (- 1.06%) log UFC/h (fig. 55A) (tableaux 20 et 21).



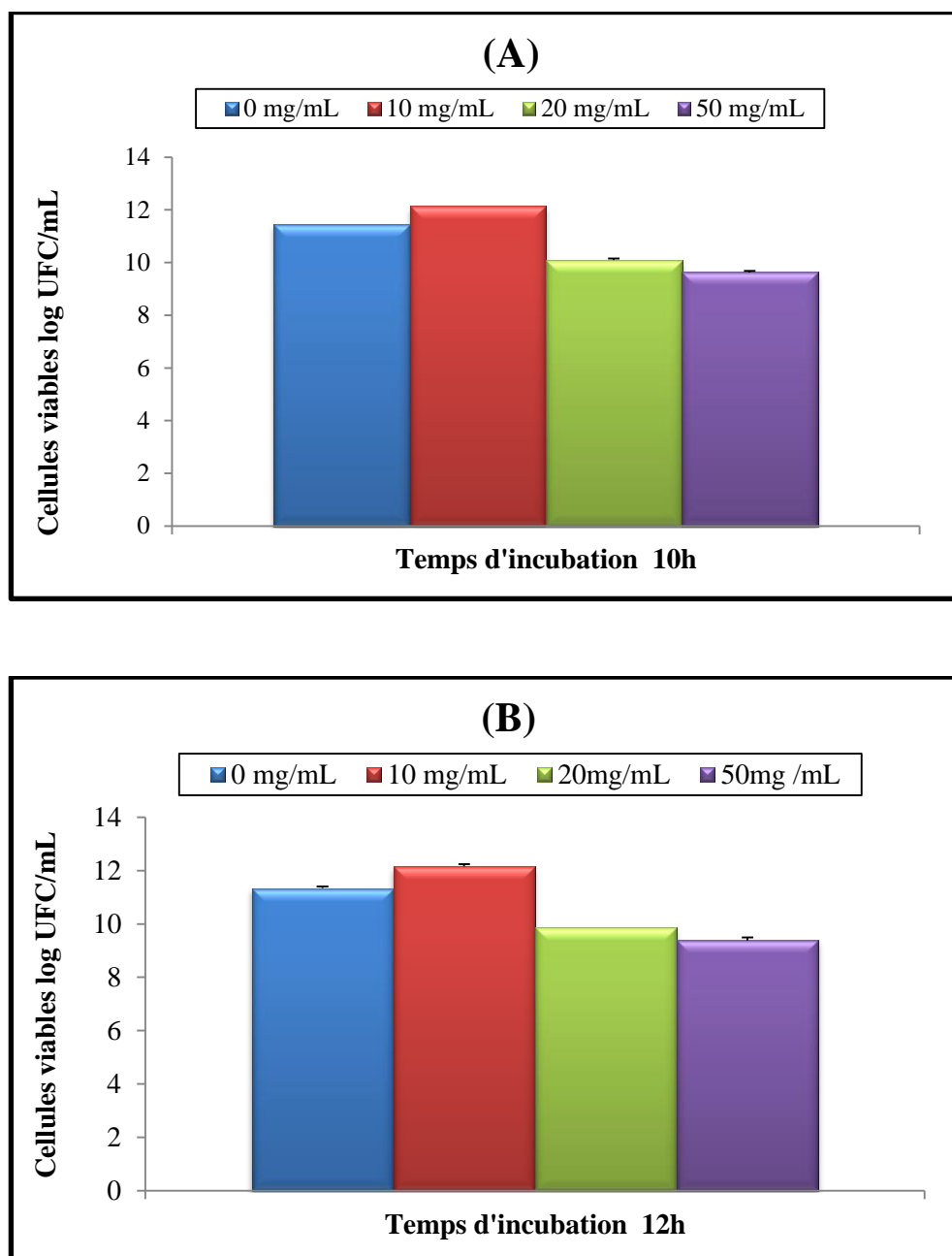
**Figure 51:** Cinétique de croissance de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10,20 et 50mg/mL d'extrait aqueux de caroube durant **36h** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ±SD.



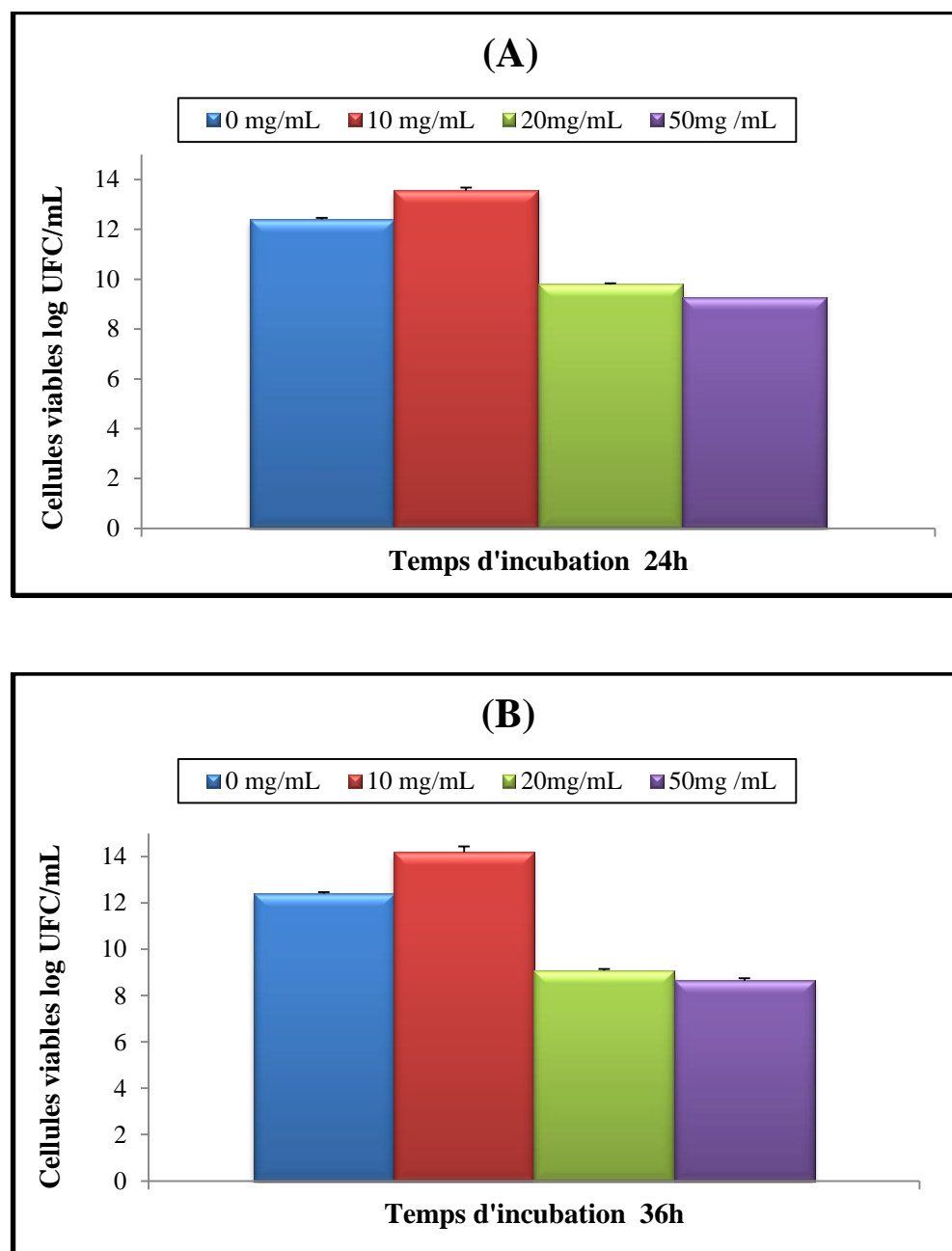
**Figure 52:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50mg/mL d'extract phénolique de caroube pendant **2h (A)** et **4h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations.



**Figure 53:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **6h (A)** et **8h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.



**Figure 54:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **10h (A) et 12 h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD



**Figure 55:** Viabilité des cellules de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (log UFC/mL) en absence (0 mg/mL) ou en présence de 10,20 et 50mg/mL d'extrait phénolique de caroube pendant **24h (A)** et **36h (B)** de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD

La prolongation de la culture de cette souche à 36h (fig. 55B) permet toujours une amélioration de sa croissance en présence de 10mg/mL correspondant à 4.42% par rapport au témoin en présence 10 mg/mL d'extrait phénolique; alors qu'aux concentrations de 20 et 50 mg/mL, l'inhibition observée antérieurement (au point 24h) s'accroît d'avantage et affiche des valeurs respectives de l'ordre de 7.3 et 7.27% (tableau 20).

Dans une étude similaire, [Booyens et Mapitsi \(2013\)](#) ont exploré les effets antimicrobiens de différentes préparations d'ail sur cinq souches de bifidobactéries en utilisant le test de diffusion sur disques. Leurs résultats ont révélé que les préparations d'ail inhibaient ces souches avec des diamètres de zones d'inhibition allant de  $13.0 \pm 1.7$  à  $36.7 \pm 1.2$  mm.

Les valeurs de CMI rapportées par ces auteurs pour les préparations d'ail variaient de 75.9 à 303.5 mg/mL. La souche *Bifidobacterium infantis* Bi -07 300B était en moyenne la plus résistante à l'ail, suivie par *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, *Bifidobacterium longum* LMG 13197, *Bifidobacterium longum* Bb356 et *Bifidobacterium bifidum* 11041.

[Haddadin et al., 2008](#) ont testé l'activité antimicrobienne d'extraits au mélange éthanol-eau (7/3 :V/V) de propolis sur *Bifidobacterium infantis* et *Lactobacillus acidophilus*. Ils ont remarqué que la réaction de ces souches à la présence d'extraits de propolis était différente de sorte que la croissance de *Lactobacillus. Acidophilus* se trouvait stimulée par rapport au témoin; alors que celle de *Bifidobacterium infantis* était inhibée.

**Tableau 20:** Cinétique d'amélioration exprimée (en % d'augmentation des cellules) ou d'inhibition (exprimé en % de réduction de cellules) de la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+15.5 $\pm$ 0.10	+7.75 $\pm$ 0.05	+2.25 $\pm$ 0.05
<b>2h-4h</b>	+4.22 $\pm$ 0.06	+2.08 $\pm$ 0.01	+1.83 $\pm$ 0.01
<b>4h-6h</b>	+6.43 $\pm$ 0.08	+3.40 $\pm$ 0.04	+3.72 $\pm$ 0.14
<b>6h-8h</b>	+17.57 $\pm$ 0.14	+0.10 $\pm$ 0.02	+6.01 $\pm$ 0.27
<b>8h-10h</b>	+0.88 $\pm$ 0.02	+11.20 $\pm$ 0.22	+5.13 $\pm$ 0.20
<b>10h-12h</b>	+0.17 $\pm$ 0.04	-2.29 $\pm$ 0.07	-2.49 $\pm$ 0.15
<b>12h-24h</b>	+12.22 $\pm$ 0.47	-0.80 $\pm$ 0.01	-1.06 $\pm$ 0.07
<b>24h-36h</b>	+4.42 $\pm$ 0.10	-7.33 $\pm$ 0.30	-7.27 $\pm$ 0.80

**Tableau 21:** Vitesse de croissance (exprimée en +log de cellules générées /h) ou d'inhibition (exprimée en -log de cellules inhibées /h) de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 en présence de 10, 20 et 50 mg/mL d'extrait phénolique aqueux de gousses de caroube à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

	10mg/mL	20mg/mL	50mg/mL
<b>0-2h</b>	+0.62 $\pm$ 0.02	+0.31 $\pm$ 0.05	+0.09 $\pm$ 0.005
<b>2h-4h</b>	+0.19 $\pm$ 0.009	+0.09 $\pm$ 0.003	+0.07 $\pm$ 0.001
<b>4h-6h</b>	+0.31 $\pm$ 0.01	+0.07 $\pm$ 0.004	+0.16 $\pm$ 0.02
<b>6h-8h</b>	+0.9 $\pm$ 0.04	+0.01 $\pm$ 0.002	+0.26 $\pm$ 0.03
<b>8h-10h</b>	+0.05 $\pm$ 0.007	+0.57 $\pm$ 0.03	+0.23 $\pm$ 0.05
<b>10h-12h</b>	+0.01 $\pm$ 0.002	-0.11 $\pm$ 0.02	-0.12 $\pm$ 0.01
<b>12h-24h</b>	+0.7 $\pm$ 0.04	-0.04 $\pm$ 0.001	-0.05 $\pm$ 0.04
<b>24h-36h</b>	+0.31 $\pm$ 0.02	-0.36 $\pm$ 0.06	-0.32 $\pm$ 0.08

# *Conclusion*

## Conclusion

L'objectif de cette étude consistait à démontrer le pouvoir inhibiteur des extraits phénoliques aqueux de gousses de caroube *Ceratonia siliqua* L. vis-à-vis d'une panoplie de bactéries pathogènes souvent incriminées dans les toxi-infections alimentaires telles que *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et à explorer l'effet de ces extraits sur le comportement de deux souches bénéfiques (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (Bb12) d'intérêt digestif.

Les résultats obtenus indiquent que l'eau (solvant à forte polarité) était plus efficace que le mélange éthanol-eau (7V/3V) dans l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes.

Nous avons constaté que la sensibilité des différentes souches bactériennes testées aux polyphénols de gousses de caroube était variable et dose-dépendante.

Sur le plan du niveau de sensibilité des souches, *E. coli* ATCC 25922 s'est révélé la plus sensible vis-à-vis de extraits phénoliques aqueux de caroube suivie de *E. coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001, et de *Bacillus cereus* ATCC 11778.

La souche pathogène *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 fait l'exception car elle est restée insensible aux extraits phénoliques aqueux de caroube.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits phénoliques de caroube obtenus avec les concentrations 20 et 50 mg/ml sont plus larges que ceux observés avec des concentrations plus basses (10 mg/mL). Les diamètres des zones d'inhibition mesurés varient de 10 à 17 mm en présence de 50mg /mL d'extrait phénolique aqueux dans le milieu.

La croissance de deux souches bénéfiques LbRE-LSAS et Bb12 a été légèrement améliorée par rapport au témoin en présence de la plus faible concentration d'extrait phénolique utilisée (10 mg/ml). Nous avons enregistré un maximum de 27% d'augmentation de la biomasse de cette souche.

Si on augmente la concentration des polyphénols à 20 et 50 mg/mL dans le milieu, *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS ressent quelque peu l'effet inhibiteur de ces composés mais sa croissance ne s'arrête pas pour autant. Ceci traduit la résistance de cette souche à l'effet antibiotique des polyphénols de gousses de caroube.

La deuxième souche bénéfique, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, qui possède le statut probiotique, est légèrement plus sensible que *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS.

Ces observations signifient que les souches bénéfiques d'intérêt digestif ne sont pas fortement inhibées par les polyphénols.

Y aurait-il une programmation biologique faisant des polyphénols, substances très répandues chez les végétaux qui les utilisent pour leur propre protection vis-à-vis des multi-agressions extérieures et donc largement consommées par les espèces animales abritant un microbiote gestionnaire de la santé de ces espèces, des sentinelles naturelles protectrices contre les germes pathogènes et non nocives pour les microorganismes promoteurs du bien être ?

Les observations préliminaires faites dans ce travail nous incitent à projeter cette problématique dans des expériences in vivo afin de voir quel serait l'effet des polyphénols sur la virulence des bactéries pathogènes les plus impliquées dans les toxi-infections, ainsi que sur le comportement des souches de la flore intestinale.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

1. **Aafi A. (1996).** Note technique sur le caroubier .Détermination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins, *Journal of food composition and analysis*, Vol. 10, pp: 166-172.
2. **Abdellaoui D., El Hassouni H., El hani s., Bengueddour R. (2013).** Antibacterial and antioxidant activity of Rhodophyceae extracts: *Grateloupia Doryphora* and *Gymnogongrus patens*. *Science lib Edition Merssene*: volume 5, N°130367. ISSN 2111-4706.
3. **Abi Azar R., (2007).** Complexassions des protéines lactières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus, *Agro paris tech Ecole Doctorale Abies*, Thèse de doctorat.
4. **AGBAKWVRV E.O.P. (2002).** The Mouth, the rose, the medicine and the environnement. Journées scientifiques de l'Université du Benin.
5. **Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A. (2007).** Production des plantes sélectionnée et greffées du caroubier. *Transfert de technologie en Agriculture*, N°153, IAV Rabat pp: 1-4.
6. **Alan L., Miller N.D. (1996).** Antioxidant flavonoids, function and clinical usage. *Alternative Medecine, Review*. 1(2), pp: 4-10.
7. **Anonyme. (2007).** Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types." *The EFSA Journal*, 579, pp: 1-61.
8. **ANRH. (2004).** Agence Nationale des Ressources Hydraulique. L'atlas pratique de l'Algérie, *Edition populaire de l'armée (EPA)*, pp:116.
9. **Avallone R., Plessi M., Baraldi M. and Monzani A. (1997).** Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and tannins, *Journal of food composition and analysis*, Vol.10, pp: 166-172.
10. **Audigié C., Dupont G., Zoszain F. (1983).** Principes des méthodes d'analyse biochimique. *Ed. Doin, T. 2*, Paris, pp: 144.

11. **Balentine C.W., Crandall P.G., Bryan C.A., Duong D.Q., Pohlman F.W. (2006).** The pre and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and Color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73, pp: 413-421.
12. **Batlle I., and Tous J. (1988).** Line as de investigati3n sobre el algarrobo (*Ceratonia siliqua L.*) en el IRTA, Catalu1a (Espa1a). In: Brito de Carvalho JH, Ed. I Encorto Linhas de Investiga3o de Alfarroba. AIDA, Oeiras: AIDA, pp: 92-104.
13. **Batlle I. and Tous J. (1997).** Carob Tree (*Ceratonia siliqua L.*), Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. Institutes of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetics Resources Institute, Rome.
14. **Baytop T. (1984).** Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present), *Publication of the Istanbul University*, N°: 3255, Istanbul.
15. **Ben hsouna A., Trigui M., Jaoua S. (1986).** Evaluation of antimicrobial and Antioxidant activities of the ethyl acetate extract of endemic *Ceratonia siliqua* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 34, N° 5, pp: 827-829.
16. **Ben hsouna A., Alayed A., Abdallahe A. (2012).** 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.
17. **Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1988).** *Bactériologie : Les bactéries des infections humaines*. Flammarion, Paris, pp: 66.
18. **Berrougui H. (2007).** Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*), une richesse nationale aux vertus médicinales, *Maghreb Canada Express* Vol. 5, N° 9.
19. **Biner B., Gubbuk H., Karhan M.,Aksu M. et Pekmezci M. (2007).** Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*) In Turkey, *Food Chemistry*. N°100, pp: 1453-1455.
20. **Biyiti L.F., Meko D.J.L., Tamzc v., Amvam Zollo P.H. (2004).** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad Afr.* 2004, Vol.13, pp:11-20.
21. **Bonnier G. (1990).** La grande flore en couleurs (tome 3), pp.309-310.
22. **Bolonos M. (1955).** Rapport sur le caroubier. Instituto forestal de Investigaciones y experiencias Madrid (Espagne), pp: 9.

23. **Boudy P., (1950).** Economie forestière Nord-Africain, Tome II : Monographie et traitement des essences forestières, *Ed. Larousse*, Paris, pp: 443-445.
24. **Booyens J. et Thantsha M.S. (2013).** Antibacterial effect of hydrosoluble extracts of garlic (*Allium sativum*) against *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 7(8), pp: 669-677.
25. **Bruneton J. (1999).** Pharmacologie-Phytochimie-Plantes médicinales, *Tech. et Doc. Ed. Lavoisier* (3<sup>o</sup> Edition), Paris.
26. **Bureš P., Pavliček T., Horová L., Nevo E. (2004).** Microgeographic genome size differentiation of the carob tree, *Ceratonia siliqua*, at 'Evolution Canyon'. *Israel. An. Bot.* 93, pp: 529-535.
27. **Catalano L., Franco I., De Nobili M., Leita L., (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods, *Agrochimica* N°43, pp: 193-205.
28. **Catalina S., Abadi B., Reppetto B., Vojnov C., Moreno S. (2009).** Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem*, 115, pp: 456-461.
29. **Chabbert Y.A. et Daguët G.L. (1985).** Sensibilité bactérienne aux antibiotiques. In: le Minor: bactériologie médicale. Flammarion, Paris.
30. **Charachon S. (2007).** Bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes , pp: 2-7.
31. **Conderet E.B. (2012).** Modalités de prise en charge de la constipation fonctionnelle de l'enfant en soins primaires : Etude menée auprès de 68 médecins généralistes hauts-normands. Faculté mixte de Médecine et de pharmacie de Rouen. Thèse de Doctorat.
32. **Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi M. (2002).** Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73, pp: 674-684.
33. **Cowan M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, 12 (4), pp: 564-570.
34. **Cuq J.L. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, pp: 21-53.

35. **Custódio L., Escapa A., Patarra J., Aligué R., Fernando Alberício F., Neng N. Nogueira J., Romano A. (2013).** Sapwood of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) a Potential Source of Bioactive Compounds. *Rec. Nat. Prod.* 7:3, pp: 225-229.
36. **De Candolle A. (1983).** L'origine des plantes cultivées. Balière, Paris, France.
37. **De man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960).** A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol*, 23, pp: 130-135.
38. **Djenane D., Yanguela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012).** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technologie*, pp: 53 - 61.
39. **Dogyan S., Turan Y., Ertuerk H., Arslan D. (2005).** Characterization and Purification of polyphenol oxydase from artichoke (*Cynara scolymus* L.), *J. Agric. Food Chem.*, N°53, pp: 776-785.
40. **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousef zadi M. (2008).** Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry*. 110, pp: 927-931.
41. **El Allagui N., Bourijate M., Tahrouch S., Hatimi A. (2007).** Action de différents extraits végétaux sur la mortalité des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* ssp. *Acta Botanica Gallica*. 154 : 503-9.
42. **Evreinoff V. A. (1947).** Agriculture tropicale; Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L., *Rev. Bot. Appl.* 389-401.
43. **Ferguson I.K. (1980).** The pollen morphology of *Ceratonia* (Leguminoscea-Caesalpinoideae). *Kew bull.* 35(2), pp: 273-277.
44. **Field, J.A., et Lettinga G. (1992).** Basic Life Science 59 , pp: 673-692.
45. **Folch I., et Guillen R. (1981).** La vegetacio dels Països Catalans. *Ed. Ketres*, Barcelona.
46. **Fournier P. (1977).** Les quatre flores de la France (générale, alpine, méditerranéenne, littorale). Le chevalier. Paris.
47. **Goldblatt P. (1981).** Cytology and phylogeny of the leguminoscea. Pp. 427-464 in advances in legume systematic. Vol. 2 (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.

48. **Gruendel S., Garcia A.L., Otto B., Mueller C., Steiniger J., Weickert M.O., Speth M., Katz N., Koebnick C. (2006).** Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans.1. *J Nutr.* ; 136 (6):1533-8.
49. **Guirand J.P., (1998).** Microbiologie Alimentaire. Dunod. P 89-95.
50. **Haddadin M.S.Y., Nazer I., Abu Raddad S.J., et Robinson R.K. (2008).** Effect of *Propolis* on Two Bacterial Species with Probiotic Potential. *Pakistan Journal of Nutrition.* 7 (2), pp : 391- 394.
51. **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Bouhadi D. (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.
52. **Hagerman A.E. (1988).** Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *J Chem. Ecol.*, 14, 453-461.
53. **Haidar M.J., Al-Taie T.S. (2009).** Treatment of candidiasis by *Ceratonia Siliqua*. *Tikrit Medical Journal*; 15(2), pp: 181-186.
54. **Haselberg C. von. (1996).** Factors influencing flowers and fruit development in carob (*Ceratonia siliqua L.*).In III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal. (in press).
55. **Hillcoat D., Lewis G., and Verdcourt B. (1980).** A new species of *Ceratonia* (Leguminocea Caesalpinoideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew bull.* 35(2), pp: 261-271.
56. **Hostettler M., Steffen R., Tschopp A. (1995).** Efficacy and tolerance of insoluble carob fraction in the treatment of travellers' diarrhoea. *J. Diarrhoeal. Dis. Res;* 13(3):155-8.
57. **Irwin H.S. and Barneby R.C. (1981).** Cassieae. in *Advances in Legume Systematic.* (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England. Vol. 1, pp: 97-106.
58. **Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakaria K.K. (2003).** Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitisvinifera*) seed extracts. *Food Research International.* vol. 36, no.2, pp: 117-122.
59. **Jimenez M., Castillo I., Azuara E., and Beristain C.I. (2011).** Antioxydant and Activity of Capulin (*Prunus serotina* subsp *capuli*) extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* Vol. 10, pp: 29-37.
60. **Jones D.K. (1953).** Carob culture in Cyprus, FAO 53/2/1225. FOA. Rome.

61. **Jones G.A.T.A., McAllister I.A.D. and Cheng K-J. (1994).** Effect of Sainfo in (Onobrychis viciifolia Scop) Condensed Tannins on Growth And Proteolysis by four Satains of Rumminal Bacteria . Applied and Environmental Microbiology. 60 (4), pp: 1374-1378.
62. **Joslyn M.A., Nishira H., Ito S., (1968).** Leucoanthocyanins and related phenolic compound of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.*, 19, pp: 543-550.
63. **Kablan B.J, Adiko M., Abrogoua D.P. (2008).** Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophthalmies en Coté d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6, pp: 282-288.
64. **Kivçak B. and Mert T. (2002).** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts. *Turk J. Biol.* 26, pp: 197-200.
65. **Kholkhal W., Ilias F., Bekhechi C. and Atik Bekkara F. (2012).** *Eryngium maritimum*: A Rich Medicinal Plant of Polyphenols and Flavonoids Compounds with Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(4), pp: 437-443.
66. **Kumazawa S., Taniguchi M., Suziuki Y., Shimura M., Kwon M., Nakayama T. (2002).** Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.*, 50, pp: 373-377.
67. **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. (2003).** Cocoa has more phenolic Phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chemistry*. 51, pp: 7292-7295.
68. **Linskens H. and Scholten W. (1980).** The flower of carob. *Potug. Acta. Bilo. (A)* XVI (1- 4), pp: 95-102.
69. **Lizardo R., Cañellas j., Mas F., Torrallardona D., 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.
70. **Loeb H., Vandenplas Y., Wursch P., Guesry P. (1989).** Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* N°8, pp: 480- 485.
71. **Makris D.P. et Kefalas P. (2004).** Carob Pod as a source of polyphenol antioxidants, *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 42, N° 2, pp: 105-108.

72. **Marakis S., Lambraki M., Diamantoglou S., (1993).** Tannin chemistry of nine cretan carob varieties. *Chimica Chronica*. New Series, 22, pp: 213-224.
73. **Marakis S., (1996).** Carob bean in food and feed: current status and future potentials a critical appraisal. *J. Food Sci. Technol*, 33, pp: 365-383.
74. **Marakis S., Marakis G., Lambraki M., (1997).** Tannins of eight carob varieties from the island of Lefkada, Greece. *Chimica Chronica*, New Series, 26, pp: 57-66.
75. **Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des diapsides ; thèse de Doctorat. Université de Limoges, pp : 23-25.
76. **Marston A., Hostettmann K. (2006).** Separation and quantification of flavonoids. In OYvind MA, Markham KR. *Chemistry, biochemistry and application*. Ed. CRC Press Taylor and Francis group, pp: 2-20.
77. **Mitrakos K. (1981).** Temperature germination responses in three Mediterranean evergreens sclerophylls. Pp. 277-279 in Components of Productivity of Mediterranean-climate Regions-Basic and Applied Aspects (N.S. Margaric and H. A. Mooney, Eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/London.
78. **Mueller-Harvey I. (2001).** Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol* ; 91, pp: 3-20.
79. **Molina-Torres J., Garcia-Chavez A., Ramrez-Chavez E. (1999).** Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoameria: affinin and capsin. *J. Ethnopharmacol*, 64, pp: 241-248.
80. **Nachtomi E., Alumot E., (1963).** Tannins and polyphenols in carob pods (*Ceratonia Siliqua*) .*Sci. Food Agric.*, 14, pp: 464-468.
81. **Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y. (2010).** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3, pp: 79-84.
82. **Nguz K. (1996).** Evaluation de la dégradation des tannins. *Phytochimiques*, pp : 225-230.
83. **Nishira H., Joslyn M.A., (1968).** The galloy glucose compounds in green carob pods. *Phytochem.*, 7, pp: 2147-2156.
84. **Okuda T., Yoshida T., Hanato T.(1989).** New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.*, 52, 1731.

85. **Ortiz P. L., Arista M., and Talavera S. (1996).** Produccion de nectar y frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua L.* (Caesalpinaceae). *Anales del Jardin Botanico de Madrid* 54, pp: 540-546.
86. **Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., and Haber B. (2003).** Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fiber, *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 41, N°12, pp: 1727-1738.
87. **Passos de Carvalho J. (1988).** Carob pollination aspects. Pp. 281-291 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, Eds.). Valencia, Spain.
88. **Perrett S., Whitfield P.J., Sanderson L., Bartelert A. (1995).** The plant molluscide *Millettia rhortningii* (leguminosae) as a topical antischistosomal agent. *Journal of Ethnopharmacology*. 47, pp: 49-54.
89. **Priolo A., Waghorn G.C., Lanza M., Biondi L. and 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.
90. **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003).** *Microbiologie*. Ed. De Boeck. ISBN 2-8041-4256-6.
91. **Quezel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.
92. **Rakib E., Chicha H., Abouricha S., Alaoui M., Bouli A., Hansali M. et Owen R. (2010).** Determination of Phenolic Composition of Carob pods Grown in b different regions of Morocco. *Journal of Natural Products*, Vol. 3, pp: 134-140.
93. **Rebour H. (1968).** *Fruits Méditerranéen, la maison rustique* Paris, pp: 330.
94. **Rejeb M.N., Laffray D., et Louguet P. (1991).** Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) en Tunisie. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, Group d'étude de l'Arbre, Paris, France, pp: 417-426.
95. **Rejeb M.N. (1995).** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans: *Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Edit. AUPELF-UREF*. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 79-85.
96. **Retana J., Ramoneda J., and Garcia delPino F. (1990).** Importancia de los insectos en la pollinisation de la Igarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16, pp: 143-150.

97. **Retana J., Ramoneda J., Garcia delPino F., and Bosch J.** (1994). Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *J. Hort. Sci.* 69(1), pp: 97-103.
98. **Riffel A., Medina L.F., Stefani V., Santos R.C., Bizani B.** (2002). *In vitro* antibacterial Activity of a new series of 1, 4- napthaquinones. *Brazillian journal of medical and biological research.* 35 (7). Pp: 811-818.
99. **Rojas A., Hernandez L., Perrada-Mirrandra R., Matg R.,** (1992). Screening for antibacterial activity of crude drug extract and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 35. pp: 275-283
100. **Ruiz-Roso B., Quintela J.C., De la Fuente E., Haya J., Pérez-Olleros L.** (2010). Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr*; 65(1):50-6. doi: 10.1007/s11130- 009-0153-9.
101. **Saura-Calixto F.,** (1988). Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *J.Food Sci.*, 53, pp: 1769-1771.
102. **Sánchez S., Lozano L.J., Godínez C., Juan D., Pérez A. and Hernández F.J.** (2010). Carob pod as a feed stock for the production of bioethanol in Mediterranean areas *Applied Energy*. Vol. 87, N°11, pp: 3417-3424.
103. **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.** (2003). Determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp: 571-581.
104. **Sbay H. et Abourouh M.,** (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.
105. **Scalbert A.** (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Photochemistry*, 30, pp: 3875-3883.
106. **Scalbert A.** (1992). Plant polyphenols. In: Quantitative Methods for the Estimation of tannins in Plant Tissues. R.W. Hemingway and P.E. Laks. *Eds*, pp: 259-280.
107. **Scalbert A., Williamson G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, pp: 2073S-2085S.
108. **Scardovi V.** (1986). Genus *Bifidobacterium*, Orla Jensen 1924, 472 In: Begay's manual of systematic bacteriology, IX Ed. *WILLIAMS et WIPKINS*. BALTIMORE.

109. **Schroeder C.A. (1959)**. Floral situation of the Carob in California, Proc. *Am. Soc. hort. Sci.* N°74, pp: 248-251.
110. **Schweinfurth G. (1894)**. Sammlung arabisch-aethiopischer Pflanzen, Ergebnisse von Reisen in dem Jahre 1881, 1888-89, 1891-92. Bull, Herb. Bossier 2, pp: 1-114.
111. **Sebai H., Souli A., Chehimi L., Rtibi K., Amri M., El-Benna J., Sakly M. (2013)**. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Medicinal Plants Research*. Vol. 7(2), pp: 85-90.
112. **Serairi-Be ji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M.H., Guemira F., Ben Mansour A. (2000)**. Peut-on associer la pulpe de caroube et la solution de réhydratation orale dans le traitement de la diarrhée aigüe, *Med. Trop.* N°60, pp: 125-128.
113. **Sfakiotakis, E.M. (1978)**. Germination in vitro of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pollen. *Z. Pflanzenphysiol.* 89, pp: 443-447.
114. **Singleton V.L. (1965)**. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol.* N°16, pp: 144-158.
115. **Sudjana A.N., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T.V. et Hammer K.A. (2009)**. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents*. Vol. 33, pp: 461-463.
116. **Sutherland J, Miles M, Hedderley D, Li J, Devoy S, Sutton K., Lauren D. (2009)**. In vitro effects of foods extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *Inter.J Food Sci. Nutri*, 60(8), 717-727.
117. **Tamir M., Nachtom E., Alumot E. (1971)**. Degradation of tannins from carob pods by thioglycolic acid. *Phytochem.*, 10, pp : 2769-2774.
118. **Teresa Fera M., Carbone M., De Sarro A., Blandino G., Riggio G., Cusumano V., Battista De Sarro G., Anzani Ciliberti F. (1998)**. Bactericidal activity of lansoprazole and three macrolides against *Helicobacter pylori* strains tested by the time-kill kinetic method. *Int. J. Ag*, 10, 285-289.
119. **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.
120. **Tous j. and Baltte I. (1990)**. El algarrobo. *Ed. Mundi-Prensa*, Madrid.
121. **Tucker S.C. (1992a)**. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Ceasalpinoideae: Cassieae). *Am. J. Bot.* 79(3): 367-327.

122. **Tucker S. C. (1992b.)** The role of floral development in studies of legume evolution. *Can. J. Bot.* 70, pp: 692- 700.
123. **Turhan I., Tetik N., Aksu M., KarhanM., Certel M. (2006).** Liquid–solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob (*Ceratinia Siliqua* L.). *Journal of Food Process Engineering.* 29/498-507.
124. **Turkmen Erol N., Sari F., Gokse P., Velioglu S.Y. (2009).** Antioxidant and Antibacterial Activities of Various Extracts and Fractions of Fresh Tea Leaves and Green Tea. *TARIM BİLİMLERİ DERGİSİ*, 15 (4), pp: 371-378.
125. **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.
126. **Waterman P.G., Mole S. (1994).** Analysis of phenolic plant metabolites, Blachewell, Oxford.
127. **Woisky, R. and Salatino, A. (1998).** Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, pp: 99-105.
128. **Würsch P., Vedevo S., Rosset J., Smily M. (1984).** The tannins granules from ripe rob pod. *Lebenesm. Wiss. Technol* ; 17, pp: 351-354.
129. **Weiduo S., Gong J., Tsao R., Kalab M., Yang R., Yin Y. (2010).** Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125, pp: 204–210.
130. **Zohary M. (1973).** Geobotanical Foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart.
131. **Zohary M., and Orshan P. (1959).** The maquis of *Ceratonia siliqua* in Israel, *Palest. J. Bot.* Jerusalem, 8, pp: 385-397.
132. **Zunft H.J., Lüder W., Harde A., Haber B., Graubaum H.J., Koebnick C., Grünwald J. (2003).** Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr*; pp: 42(5): 235-42.
133. **FAOSTAT (2010).** [www.fao.org](http://www.fao.org).

## Résumé

La présente étude porte, d'une part, sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits phénoliques de gousses de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) récoltées dans la région de Mostaganem sur huit souches pathogènes (*Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), et d'autre part, sur l'effet de ces extraits sur le comportement de deux souches bénéfiques (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12) en utilisant la méthode de diffusion sur disque et en suivant la cinétique d'inhibition. Les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été respectivement déterminés par la méthode Folin-Ciocalteu et par celle au trichlorure d'aluminium dans deux types d'extraits phénoliques de gousses de caroube: l'extrait éthanol-eau (7V/3V) (EPC) (23,79mg/g) et l'extrait aqueux (EAPC) (32,2 mg/g). C'est la souche *E. coli* ATCC 25922 qui s'est révélé la plus sensible vis-à-vis des extraits phénoliques aqueux de caroube suivie de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001 et de *Bacillus cereus* ATCC 11778, dont les zones d'inhibition varient de 10 à 17mm en présence de 50mg/ml. La croissance des deux souches bénéfiques LbRE-LSAS et Bb12 a été légèrement améliorée par rapport au témoin en présence de la plus faible concentration d'extrait phénolique utilisée (10 mg/ml) avec un taux maximal d'amélioration de 27%. En revanche, les fortes concentrations de 20 et 50 mg/ml retardent la croissance de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS qui résiste plus que la Bb12 à l'effet inhibiteur des polyphénols. Ces résultats suggèrent l'utilisation de l'extrait phénolique de caroube comme agent conservateur des aliments contre les contaminations bactériennes causées par un bon nombre de pathogènes sans pour autant affecter la croissance des souches bénéfiques ou probiotiques d'intérêt digestif.

**Mots clés :** Caroube-Gousse-Polyphénols-Flavonoïdes-Activité antimicrobienne- Bactéries pathogènes-Bactéries bénéfiques.

## Abstract

The goal of the present study is to explore the antimicrobial activity of phenolic carob pods extract (*Ceratonia siliqua* L.) against eight pathogenic strains (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC p4001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and also its effect on survival of two beneficial strains (*Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12). Carob fruits were collected in Mostaganem area. Disk diffusion method was used for the determination of inhibition zone diameter and cell count was monitored during the whole exposure of the strains to the extract. Total polyphenols (Folin-Ciocalteu method) and total flavonoids (method of aluminum trichloride) were determined in the two carob extracts: ethanol-water extract (7v/3v) (EWPC) (23.79 mg/g) and aqueous extract (EAPC) (32.2 mg/g). *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was the most sensitive strain toward the phenolic extract of carob pods followed by *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Shigella sonnei* ATCC p4001, and *Bacillus cereus* ATCC 11778, with an inhibition zone diameter ranging from 10 to 17 mm in the presence of 50 mg/ml carob aqueous phenolic extract. Beneficial strains (LbRE - LSAS and Bb12) growth was slightly improved compared to the control in the presence of the lowest phenolic extract concentration used (10mg/ml), reaching 27% of maximal biomass improvement. In contrast, the higher phenolic extract concentrations (20 and 50 mg/ml) delay the growth of *Lactobacillus rhamnosus* strain LbRE-LSAS which is the more resistant strain to the inhibitory effect of polyphenols comparatively to Bb12 strain. These results may suggest that phenolic extract of carob could be used as a food preservative agent against a number of pathogens without any significant inhibition of beneficial or probiotic strains of digestive interest.

**Keywords:** Carob-Pod-Polyphenols-Flavonoids, Antimicrobial activity-Pathogenic bacteria-Beneficial bacteria.