



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abd-elhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département des Sciences Agronomique

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



MEMOIRE DE MAGISTER

EN HYGIENE ET SECURITE ALIMENTAIRE

Intitulé

**Effet du sirop de caroube sur les aptitudes
fermentaires et le développement des
bactéries lactiques sur milieu lait écrémé**

Présenté par :

Mr BOUZIANE NABIL

Soutenu le :.....2013 devant le jury d'examen composé de :

Mr Lotmani B.	Pr Président	Univ.de Mostaganem
Mr Benali M.	Pr Examineur	Univ. Sidi-Bel-Abbes
Mr Dilmi Bouras A.	Pr Examineur	Univ. Chelef
Mr Riazi A.	Pr Directeur de recherche	Univ. Mostaganem

Année universitaire : 2013/2014

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, qui se sont sacrifiés pour ma réussite et m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes années d'étude.

A mon fils Younes

Mes frères et sœur : Karima, Mohamed, Rachid, Djamel et Ali

La mémoire de mes grands parents paternels et maternel

A mon épouse, pour son soutien, son encouragement et sa contribution à la réalisation de ce travail

Mes chers beaux parents, pour leur gentillesse et encouragement.

A toute ma famille

A l'ensemble du personnels du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)

Mes deux chers amis : Houari et Abdenour

A tous mes amis ainsi qu'à mes camarades de promotion.

Enfin à tous ceux et toutes celles qui m'ont apporté un soutien moral ou matériel.

Avant propos

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem dirigé par le Pr Ali Riazi auquel j'exprime mes respects et mes remerciements pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et initié aux rudiments de ce domaine si passionnant qu'est la recherche. Je vous remercie, Pr Riazi, également pour les enseignements en graduation et en post-graduation que vous m'avez prodigués.

Mes vifs remerciements sont adressés à Mr Brahim Lotmani, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis, d'avoir accepté de présider mon jury malgré l'étroitesse de son temps et ses grandes responsabilités.

Je voudrais aussi que Mr Abdelkader Dilmi Bouras, Professeur à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef, mon enseignant en année théorique de cette formation, trouve ici l'expression de ma reconnaissance, de mes respects et de mes remerciements pour sa participation à mon jury en tant qu'examineur.

J'adresse mes sincères remerciements à mon enseignant, Mr Mohamed Benali, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbes pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également tous mes enseignants à tous les niveaux pour avoir contribué à ma formation.

Que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mes chaleureux remerciements.

Mostaganem, Décembre 2013

N. Bouziane

Résumé

Une souche bifide expérimentale, *Bifidobacterium longum* (BL42), a été cultivée en présence de sirop de caroube comme ingrédient prébiotique aux concentrations de 5 et 10%. La cinétique de croissance et d'acidification du milieu lait écrémé et reconstitué (10% ; P/V), la viabilité des souches impliquées dans la fermentation et l'évolution du pH des laits fermentés au cours de l'entreposage à 4°C pendant 28 jours, ont été suivies en culture pure ou mixte avec *Streptococcus thermophilus* et/ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. Les résultats ont montré que le sirop de caroube testé aux concentrations de 5 et 10% stimule ($P \leq 0,05$) la capacité de croissance de la souche bifide étudiée. Le temps de génération des deux souches lactiques était significativement raccourci ($P \leq 0,05$) et leur activité acidifiante étaient améliorées en présence de 5% de sirop de caroube et ce par rapport à leurs témoins correspondants. En culture associée, le temps de coagulation était presque identique à celui obtenu par le témoin. Toutefois, les résultats étaient différents en présence de 10% de sirop de caroube : inhibition et stimulation ($P \leq 0,05$) respectivement de *L. bulgaricus* et *St. thermophilus* en culture pure et leur inhibition toutes les deux en culture associée ($P \leq 0,05$). Dans le cas de la culture associée d'une souche bifide (BL42) et des deux bactéries lactiques en même temps en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube, il y a amélioration notable de la quantité de biomasse accumulée par la souche bifide BL42 (9 à 14%). D'une manière générale, en culture pure ou mixte avec les deux ferments lactiques, le sirop de caroube exerce un effet adoucisseur sur la post acidification des laits fermentés et permet de préserver les qualités sensorielles et organoleptiques du produit frais. La viabilité de souches lactiques était significativement maintenue au niveau requis par la législation.

Mots clefs: Sirop de caroube-lait-bactéries lactiques-Fermentation-Survie-Conservation.

Abstract

An experimental strain of Bifidobacteria (BL42) was cultivated in the presence of 5 and 10% of carob Juice as prebiotic. The growth and acidity kinetics were studied, also the viability and pH evolution during conservation at 4°C for 28 days in both pure and mixt culture with *Streptococcus thermophilus* and/or *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*. The results showed that 5 and 10% of carob juice stimulated the growth of BL42. The growth and acidity of both lactic bacteria were improved with 5% of carob. While in the mixt culture, the coagulation time was almost the same with the control. The addition of 10% of the carob affect badly the growth of *L. bulgaricus* but *St. Thermophilus* was stimulated in pure culture and inhibited in coculture. In the post acidification, the addition of carob juice maintains the viability of these strains.

Keywords : Carob juice- lactic bacteria-viability-conservation.

Liste des abréviations

EM	:	Energie métabolique
PEG	:	Polyéthylène glycol
Ha	:	Hectare
FAO	:	Food and Agriculture Organization
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
CMP	:	Caséinomacropéptide
WPC	:	Concentrât protéique du lactosérum
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
MICI	:	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
CSAH	:	Comité scientifique de l'alimentation humaine
FOS	:	Oligosaccharides de fructose
GOS	:	Oligosaccharides de galactose
AGCC	:	Acides gras à chaînes courtes
ITA	:	Institut de technologie agricole
FTAM	:	Flore aérobie mésophile
DS	:	Dilution simple
LAB	:	Le comptage des bactéries lactique

Liste des tableaux

Tableau 1: Différents espèces de Lactobacilles identifiées comme probiotiques.....	5
Tableau 2 : différentes espèces bifides d'origine humaine, animale ou environnementale identifiées (Euzéby, 2005).....	6
Tableau 3: Exemples de produits probiotiques commerciaux et leurs indications...	11
Tableau 4. Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés).....	16
Tableau 5. Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (FAO/WHO,2002).....	19
Tableau 6: Exemples de composés prébiotiques commercialisés (Grizard and Barthomeuf, 1999; Franck, 2002).....	23
Tableau 7: différents types de cultures réalisées et conditions de culture.....	43
Tableau 8: Valeurs moyennes de pH enregistrées au cours de la fermentation du lait à 42°C par la culture mixte <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....	57
Tableau 9: Evolution du pH du lait au cours de la fermentation à 37°C par la monoculture de la souche bifide BL42.....	59
Tableau 10: Evolution du pH du lait fermenté par la coculture des starters, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> , et de la souche bifide BL42 en absence et en présence 5% et 10% de sirop de caroube.....	62

Liste des figures

- Figure 1.** Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches Commercialisées (Izquierdo Alegre, 2009).....4
- Figure 2 :** Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (FAO/WHO, 2002).....18
- Figure 3:** Structure des FOS Actilight et des FOS Raftilose.....24
- Figure 4:** Structure des GOS α -1,2/ α -1,6/ α -1,4.....27
- Figure 5 :** Aspect du fruit mûr du caroubier.....30
- Figure 6 :** Cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* en présence de *Streptococcus thermophilus* et de la souche bifide BL42 au cours de la fermentation du lait à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.....49
- Figure 7 :** Cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* en présence de *Lactobacillus bulgaricus* et de la souche bifide BL42 au cours de la fermentation du lait à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.....50
- Figure 8 :** Cinétique de croissance de la *Bifidobacterium longum* BL42 en coculture avec les starters *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en absence (contrôle) ou en présence de 5 et 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.....53
- Figure 9 :** Cinétique d'acidification du lait par la culture mixte *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à 42°C en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....56
- Figure 10 :** Cinétique d'acidification du lait fermenté à 37°C par la monoculture de la souche bifide BL42 en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....58
- Figure 11 :** Cinétique d'acidification du lait par la coculture à 37°C des starters, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, avec la souche bifide BL42 en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....61

Figure 12 : Viabilité post-fermentaire de *Streptococcus thermophilus* au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture mixte des starters en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....64

Figure 13 : Viabilité post-fermentaire de *Lactobacillus bulgaricus* au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture mixte des starters en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....66

Figure 14 : Viabilité post-fermentaire de *Bifidobacterium longum* BL42 au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture associée des starters et de BL42 en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.....68

Sommaire

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

I.1. Généralités sur les probiotiques et les prébiotiques.....	15
I.1.1. Les probiotiques.....	15
I.1.1.1. Définition du concept probiotique.....	15
I.1.1.2. Principales espèces probiotiques.....	16
I.1.1.2.1. Les Lactobacilles.....	16
I.1.1.2.2. Les bifidobactéries.....	17
I.1.1.3. Les probiotiques: un vrai facteur santé.....	22
I.1.1.4. Sélection des probiotiques.....	28
I.1.2. Les prébiotiques.....	30
I.1.2.1. Définition du concept « prébiotique ».....	30
I.1.2.2. Caractérisation, innocuité et réglementation des prébiotiques.....	33
I.1.2.3. Nécessité de l'indigestibilité du prébiotique pour l'homme.....	34
I.1.2.4. Sécurité d'emploi des prébiotiques.....	35
I.2.1.4. Principaux prébiotiques utilisés par les industries alimentaires.....	36
I.2.1.4.1. L'inuline et les fructo-oligosaccharides (FOS).....	37
I.2.1.4.1.1. Structure, obtention et utilisation.....	37
I.2.1.4.1.2. Effet des « FOS » sur la santé.....	38
I.2.1.4.2. Les gluco-oligosaccharides (GOS).....	39
I.2.1.4.2. Le lactulose.....	39
I.2.1.4.3. Autres prébiotiques.....	41
I.2. Généralités sur le caroubier.....	41
I.2.1. Étymologie et taxonomie.....	41
I.2.2. Caractères biologiques.....	42
I.2.3. Ecologie et répartition géographique.....	43
I.2.4. Composition chimique et intérêts de la caroube.....	45

I.2.5. Utilisation du caroubier.....46

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Nature et origine des souches utilisées.....51

II.2. Origine des gousses et obtention du sirop de caroube.....51

II.3. Contrôle de la charge microbienne originelle du sirop.....51

II.4. Pasteurisation du sirop de caroube et choix de concentrations utilisées.....51

II.5. Préparation du lait à fermenter.....52

II.6. Conditions et types de cultures envisagées.....52

II.6.1. Les milieux de culture.....52

II.6.1.1. Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe).....52

II.6.1.2. Dilution simple (DS).....53

II.6.1.3. Milieu M17.....53

II.6.1.4. Milieu ST54

II.6.2. Les conditions de croissance.....54

II.6.3. Les différents types de cultures sur milieu lait avec ou sans sirop de caroube.....55

II.6.3.1. Les cultures starters pures.....55

II.6.3.2. La culture bifide pure.....55

II.6.3.3. Les cultures associées « starters + bifidobactérie ».....56

II.7. Détermination de la cinétique de croissance.....56

II.8. Détermination de la cinétique d'acidification.....57

II.8. Détermination de la survie des souches dans le lait fermenté entreposé à 4°C.....58

II.9. Traitement statistique des résultats.....58

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Effets du sirop de caroube sur le comportement fermentaire des souches.....	60
III.1.1. Effet du sirop de caroube sur la cinétique de croissance.....	60
III.1.1.1. Effet sur la croissance des starters du yaourt.....	60
III.1.1.2. Effet sur la croissance de Bifidobacterium longum BL42.....	63
III.1.2. Effet du sirop de caroube sur la cinétique d'acidification.....	65
III.1.2.1. Cas des starters du yaourt.....	65
III.1.2.2. Cas de Bifidobacterium longum BL42.....	68
III.1.2.2.1. Monoculture de BL42.....	68
III.1.2.2.2. BL42 en culture associée avec les starters du yaourt.....	73
III.2. Effets du sirop de caroube sur la viabilité post-fermentaire des souches au cours de l'entreposage du lait fermenté à 4°C.....	75
III.2.1. Viabilité post-fermentaire de Streptococcus thermophilus.....	75
III.2.2. Viabilité post-fermentaire de Lactobacillus bulgaricus.....	78
III.2.3. Viabilité post-fermentaire de Bifidobacterium longum BL42.....	79
Conclusion.....	82
Références bibliographiques.....	84

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les probiotiques et les prébiotiques

I.1.1. Les probiotiques.

I.1.1.1. Définition du concept probiotique.

L'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler la flore endogène dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques est à la base du concept de probiotique

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques.

Cette notion de probiotique a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines (Metchnikoff, 1907).

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposé par Lilly et Stillwell en 1965. Ensuite, Parker (1974) a élargit cette définition à des « microorganismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques.

Plus tard, Fuller (1989), propose une définition très proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

Par opposition aux précédentes définitions, la définition suivante introduit la notion de souche définie bien caractérisée d'un point de vue taxonomique ainsi que la notion de quantité apporté à l'homme. La FAO (Food and Agricultural Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; appelée WHO en anglo-saxon: World Health Organization) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments (FAO/WHO, 2002) et formulent la définition suivante : « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère».

I.1.1.2. Principales espèces probiotiques

Le plus souvent, les microorganismes utilisés comme probiotiques proviennent d'isolats humains constitués d'espèces que l'on retrouve parmi la flore résidente, et l'accent est ainsi mis sur le rétablissement de l'équilibre écologique de la flore intestinale. C'est l'une des raisons pour lesquelles les principales souches reconnues en tant que probiotiques et utilisées dans les produits alimentaires appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Fig. 1). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin, connues pour ne pas présenter de risque toxique ou infectieux et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (Izquierdo Alegre, 2009).

I.1.1.2.1. Les Lactobacilles

Les lactobacilles sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés et Gram-positifs faisant partie du groupe des LAB (Lactic Acid Bacteria).

Ils sont importants pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations laitières et végétales. Dans le corps humain, les espèces de lactobacilles font partie de la flore naturelle de la bouche, de l'intestin grêle, du côlon et du vagin. Même si elles y sont présentes, les espèces de lactobacilles ne sont pas prédominantes dans le tractus gastro-intestinal.

Ce sont des bactéries anaérobies qui tirent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des glucides.

Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique.

Une grande variété de lactobacilles est utilisée comme probiotiques, parmi lesquels figurent en tête *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* (Tableau 1) (Izquierdo Alegre, 2009).

I.1.1.2.2. Les bifidobactéries

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est une forme bifide en Y. Elles sont non sporulées, Gram-positives, hétéro-fermentaires, anaérobies strictes et productrices d'acide lactique et acétique. Même si elles partagent des caractéristiques phénotypiques avec les LAB, et même si parfois elles sont considérées comme tel pour des questions pratiques, les bifidobactéries ne sont pas de "vraies" LAB.

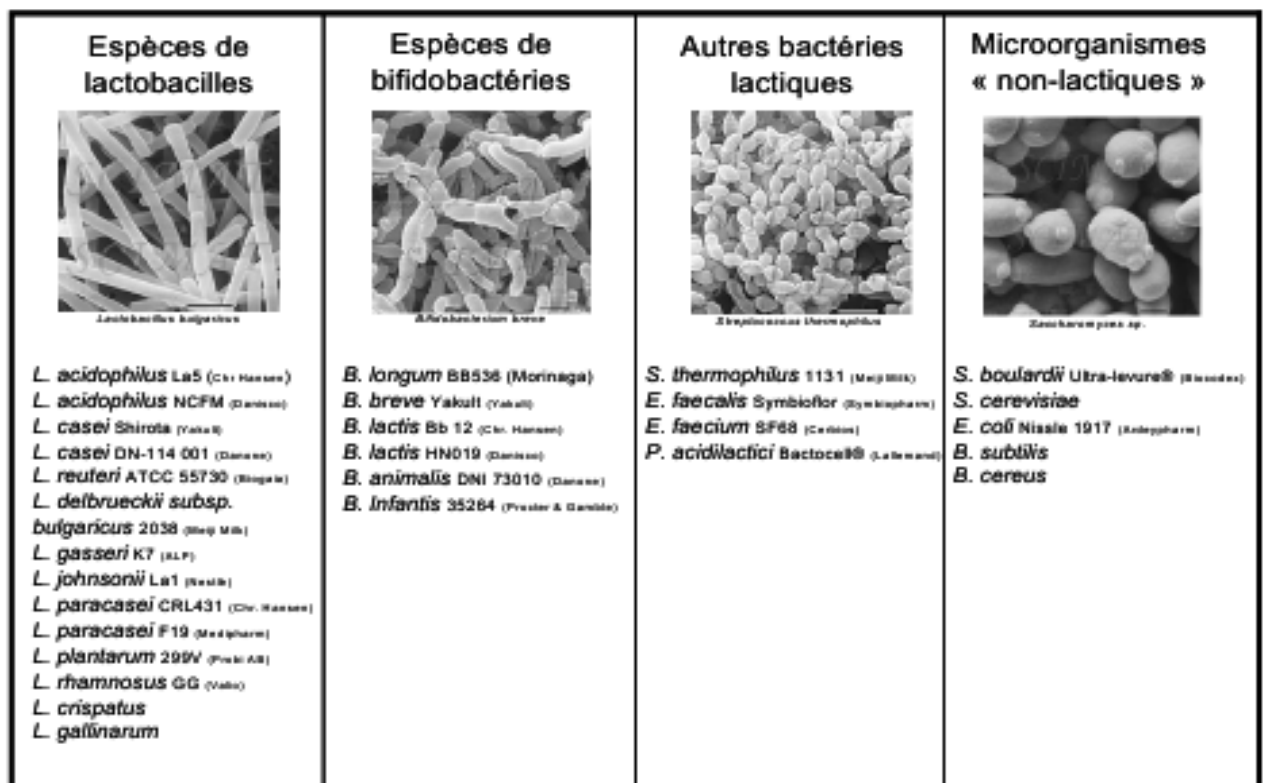


Figure 1. Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches Commercialisées (Izquierdo Alegre, 2009)

Tableau 1: Différents espèces de Lactobacilles identifiées comme probiotiques

Souches	Producteur	Produits	Allégations
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Finlande)	Yaourts à boire	Prévention des allergies
<i>Lactobacillus johnsoni</i> La1 (Lj1)	Nestlé (Suisse)	Yaourts à boire	Inhibition du développement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114001	Danone (France)	Yaourts à boire	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'incidence des diarrhées
<i>Lactobacillus casei</i>	Chr. Hansen (Denmark)	Formules infantiles	Stimulation de la production d'IgA

Tableau 2 : différentes espèces bifides d'origine humaine, animale ou environnementale identifiées (Euzeby, 2005)

Espèces bifides d'origine humaine	Origine
<i>B. adolescentis</i>	Fèces d'adultes
<i>B. angulatum</i>	Fèces d'adultes et d'enfants
<i>B. bifidum</i>	Fèces d'adultes, d'enfants et du vagin
<i>B. parvulorum</i>	Fèces d'enfants et du vagin
<i>B. catenulatum</i>	Fèces d'adultes, d'enfants et du vagin
<i>B. dentium</i>	Carie dentaire et fécés d'adultes
<i>B. Gallicum</i>	Fèces d'adultes
<i>B. Longum biovar infantis</i>	Fèces d'enfants
<i>B. Longum biovar longum</i>	Fèces d'adultes, d'enfants et du vagin
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Fèces d'enfants
Espèce bifides d'origine alimentaire et environnementale	Origine
<i>B. Animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> (Bb12)	Laits fermentés principalement
<i>B. minimum</i>	Eaux usées
<i>B. subtile</i>	Eaux usées
<i>B. Thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Eaux usées

Elles sont présentes dans la flore normale des humains, et sont le genre prédominant parmi la flore intestinale des nourrissons, bien que leurs niveaux décroissent pendant l'allaitement. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (connue sous l'abréviation commerciale « Bb12 ») et *Bifidobacterium longum*.

Un autre genre de LAB ayant fait l'objet de nombreuses études en vue de potentielles applications probiotiques est le genre *Enterococcus*, particulièrement les espèces *faecium* et *faecalis* (Agerbaek et al, 1995). Les entérocoques sont des bactéries cocci, Gram-positives, naturellement présents dans le tractus gastro-intestinal et dans de nombreux aliments. Toutefois, l'utilisation des entérocoques chez l'homme reste très controversée, étant donné qu'ils sont parfois associés à la contamination fécale et à la résistance aux antibiotiques.

C'est pour cela que la sélection correcte des souches et les tests d'innocuité prennent une importance vitale dans le cas des entérocoques et permettent de garantir l'innocuité des souches utilisées. Ces souches sont le plus souvent utilisées comme probiotiques pour les animaux, mais ils existent des produits refermant des cultures vivantes d'*E. faecalis* ou d'*E. faecium* et destinés à l'utilisation humaine, tels que Symbioflor ou Bioflorin qui sont commercialisés en Allemagne, en Autriche et en Suisse.

D'autres microorganismes ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisés comme probiotiques, et montrer des effets thérapeutiques importants tels que l'immunostimulation. L'un des meilleurs exemples est représenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dont les effets sont les mieux documentés (Vidon et al, 1986).

Sur le plan des industries laitières, les bifidobactéries n'apprécient pas les forts potentiels oxydants du lait. Il est donc fréquemment nécessaire d'ajouter des substances réductrices au milieu pour obtenir des conditions d'anaérobiose favorable. Les extraits de levure et les hydrolysats de caséines bovines ajoutés au milieu lait améliorent la croissance et la production d'acides par ces bactéries, excepté l'espèce *B. infantis*.

La majorité des auteurs relie la faible croissance des souches testées dans le lait non supplémenté à la diminution du nombre de groupements amines libres et par conséquent à celle de l'activité protéolytique.

Parmi l'ensemble très complexe des molécules présentes dans l'extrait de levure, la fraction azotée (acides aminés libres et peptides) pourrait être à l'origine de cette stimulation (Roy et al, 1990)

Plusieurs difficultés d'ordre technologique doivent être surmontées pour aboutir à des produits de qualité satisfaisante. En plus, plusieurs études (Riazi et Ziar, 2008; Riazi et Ziar, 2010 ; Ziar et al., 2012; Riazi et Ziar, 2012 ; Ziar et al., 2013) ont essayé d'améliorer cette croissance sur milieu lait par divers moyens.

Janer et al. (2004) avaient suggéré de supplémenter le lait avec 2% de CMP (caséinomacropéptide) qui sont des extraits de lactosérum du fromage sucré ou de WPC (concentrat protéique du lactosérum). Ces auteurs ont observé une augmentation du nombre de *B. lactis* après 24h de fermentation à 37°C égale à 1,5 unité log par comparaison au lait témoin non additionné de CMP. Par contre, la biomasse la plus importante a été enregistrée avec l'addition de WPC (de l'ordre de 9,1 log UFC/ml).

Il est à signaler que le faible pouvoir de croissance des bifidobactéries en culture pure sur milieu lait a été rapporté par plusieurs travaux (Ventling et Mistry, 1993) qui avaient constaté la faible biomasse produite associée à un pH moyen (≤ 5) à la coagulation, une consistance fragile et une saveur douce.

Samona et al (1996) avaient observé le même comportement de souches de bifidobactéries monocultivées sur lait écrémé et ont confirmé les résultats de Desjardins et Roy (1990). Ces derniers auteurs ont constaté que la croissance des *B. bifidus* et *B. longum* n'était pas couplée à la production d'acides organiques et que 55 à 5% d'acides lactique et acétique sont produits durant la phase stationnaire de croissance, renforçant ainsi les observations concernant les niveaux élevés d'acide lactique et surtout acétique produits après que la biomasse a cessé d'augmenter (24h d'incubation).

Par ailleurs, la nature du lait joue un rôle prépondérant dans l'amélioration de la croissance des bifidobactéries selon les résultats des essais sur lait ultrafiltré et concentré (Ventling et Mistry, 1993), sur lait de chamelle (Abu-tarabush et al, 1998) ou sur le lait de soja (Chou et Hou, 2000).

Cependant, en culture pure avec les bactéries lactiques, la croissance des bifidobactéries est souvent lente ou limitée par rapport à celle des bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers fermentés (Roy, 2005).

Dave et Shah (1997) ont noté un temps de génération des souches bifides compris entre 0,7 et 4 dans le cas des cultures mixtes probiotiques avec les bactéries lactiques. Ce temps dépend du type de souche lactique utilisé.

Les bifidobactéries peuvent être utilisées seules mais sont souvent associées à des bactéries lactiques pour des raisons organoleptiques et technologiques (Sallof-Coste, 1997). De plus, la présence de bactéries protéolytiques, en particulier *L.bulgaricus*, favorise la croissance des bifidobactéries.

I.1.1.3. Les probiotiques: un vrai facteur santé

Le Tableau 3 montre certains des produits commerciaux contenant des souches probiotiques vendus en France et les indications pour lesquelles ils sont conseillés. Des effets positifs nombreux et variés sont ainsi attribués à ces microorganismes (tableau 4). Beaucoup de ces effets ont été démontrés avec des études cliniques sur l'homme. Cependant, d'autres ne sont pas avérés ou sont simplement basés sur des tests in vitro ou sur des essais avec des animaux. Par ailleurs, les mécanismes d'action impliqués dans la plupart de ces effets restent loin d'être élucidés (Izquierdo Alegre, 2009).

- Amélioration de la digestion du lactose

L'un des effets des LAB qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose (De Vrese et al, 2001). Ce disaccharide, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucose et de galactose reliés entre eux par une liaison β . Sa digestion nécessite une lactase, ou β -galactosidase, qui hydrolyse cette liaison et permet alors l'absorption des sucres simples libérés. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de cette enzyme est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion-absorption intestinale ou une accélération du transit jéjunal, comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des LAB participait à la digestion du lactose dans l'intestin (De Vrese et al, 2001). En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire) (Arrigoni et al, 1994). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose (Drouault et al, 1999), et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (Marteau et al, 2002). Finalement, dans le même registre de la digestion et de la tolérance aux disaccharides, il a été montré que l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* aidait à la digestion du saccharose chez des enfants déficients en saccharase (Harms et al, 1987).

- Réduction de la cholestérolémie

Il a été observé que, par rapport à des témoins, les animaux élevés en environnement stérile, et donc exempts de microorganismes, excrètent des niveaux de cholestérol dans les selles plus faibles, ce qui a suggéré que la flore intestinale aurait une influence sur les niveaux de cholestérol sanguin (Danielsson et Gustafsson, 1959).

Des tests in vitro ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus* (Zhang et al, 2008; Ziar et al, 2013). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Liong et Shah, 2005).

Tableau 3: Exemples de produits probiotiques commerciaux et leurs indications.

Produit	Souche	Effet revendiqué
Activia® (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Aide à réguler le transit
Actimel® (Danone)	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>L. casei</i> Shirota	Régule le transit et renforce les défenses naturelles
BION®3 (Merck)	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> + vitamines + minéraux	Renforce les défenses naturelles de l'organisme. Aide à retrouver la forme
BION®Transit (Merck)	<i>L. plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
BION®Voyage (Merck)	Probio-Tec® Quatro : <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> LBY-27	Réduit la diarrhée du voyageur
BION®Flore intime (Merck)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC 14	Restaure et protège l'équilibre de votre flore vaginale
VSL#3®	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéraire et de la pouchite.
Lacteol® (Axcan Pharma)	<i>L. acidophilus</i>	Evite la diarrhée
Ultra-Levure® (Biocodex)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Evite la diarrhée
Gefilus® (Valio)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Renforce les défenses naturelles de l'organisme, multiples effets sur la santé

Bien que la déconjugaison des sels biliaires puisse avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte.

En effet, il a été suggéré que les sels biliaires secondaires qui en découlent (acide désoxycholique et lithocholique) endommagent l'ADN, augmentent les risques de cancer du colon et de calculs biliaires et peuvent causer des altérations de muqueuses digestives provoquant de l'inflammation et de la diarrhée (Ridlon et al, 2006).

En ce qui concerne la déshydroxylation des acides biliaires par les bactéries intestinales, celle-ci n'est toutefois attribuée qu'aux genres *Clostridium* et *Eubacterium* (Bernalier-Donadille, 2009).

Les bactéries les plus fréquemment désignées comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugés.

Une autre explication évoque une diminution du taux de cholestérol qui serait uniquement due à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugés, phénomène qui ne peut pas se produire in vivo car le pH est plus élevé que dans un milieu de culture acidifié par les LAB. Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation de produits laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (Pereira et Gibson, 2002).

- Diminution des allergies alimentaires

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des LAB ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (Isolauri et al, 2000). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L. rhamnosus* GG et *B. animalis lactis* Bb12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (Kalliomaki et al, 2001).

Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus. Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des LAB (Isolauri et al, 2000). Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (Isolauri et al, 1993). Elles pourraient également influencer directement les mécanismes régulateurs de la tolérance orale. Les premières données cliniques sont prometteuses, cependant, d'autres études sont nécessaires pour apporter des preuves supplémentaires quant aux effets protecteurs des LAB dans les processus allergiques et quant aux mécanismes impliqués.

- Réduction du risque de diarrhées

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des modèles animaux.

Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire (Gill, 2003).

Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques (Hickson et al, 2007) et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus (Szymanski et al, 2006). Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances.

L'une des affections les plus fréquentes, la diarrhée du voyageur, est une situation clinique le plus souvent due à un mécanisme infectieux. De nombreux produits pharmaceutiques destinés à prévenir cette pathologie existent sur le marché, comme par exemple Bion®Voyage (Merck) et Ultra-Levure® (Biocodex).

Cependant, les études randomisées et contrôlées ayant été menées n'ont pas permis de démontrer un effet indiscutable d'un probiotique sur la diarrhée du voyageur, soit du fait d'une méthodologie statistique critiquable, soit du fait d'un trop grand nombre de sujets ayant abandonné l'étude (Marteau et al, 2002).

- Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin

Les formes les plus connues de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et la pochite. De nombreux travaux ont montré que certains microorganismes de la flore endogène pouvaient jouer un rôle nocif pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif (Marteau et al, 2003).

Des antibiotiques sont utilisés pour traiter la pochite et prévenir la rechute post-opératoire de la maladie de Crohn. Il a aussi été trouvé que tous les microorganismes n'ont pas le même potentiel pro-inflammatoire car ils sont perçus différemment par les cellules intestinales ou immunitaires.

Il y a des différences significatives d'influence de la flore intestinale chez des sujets sains et chez des sujets atteints de MICI. Ces constatations ont motivé les études sur les possibles effets bénéfiques des microorganismes probiotiques dans modulation des MICI (Izquierdo Alegre, 2009).

Des travaux ont ainsi suggéré des effets positifs des souches *Escherichia coli* Nissle 1917, *L. rhamnosus* GG, et du mélange de probiotiques VSL#3 dans la prévention des rechutes dans les cas de colites, de la pochite ou encore de la maladie de Crohn (Zocco et al, 2006).

Néanmoins, d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence des différences significatives entre un traitement probiotique et un placebo (Isaacs et Herfarth, 2008).

Des études supplémentaires sont encore nécessaires en vue de l'application clinique des probiotiques dans le traitement des MICI, mais les résultats positifs obtenus sont sûrement très encourageants (Izquierdo Alegre, 2009).

- Prévention du cancer du côlon et autres cancers

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique, ces deux paramètres pouvant être eux-mêmes modulés par des probiotiques (tableau 4). Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique (Rafter, 2002). Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les

procancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin.

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries et l'incidence des cancers du colon et du poumon (Van't Veer et al, 1991). Des expériences chez l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement (Perdigón et al, 1998). Deux études randomisées et contrôlées au Japon ont montré que l'administration orale de *L. casei* souche biolactis diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeurs superficielles de la vessie chez l'homme (Aso et al, 1995).

D'un autre côté, bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales directes de la suppression des cancers par la consommation de cultures probiotiques; il existe de nombreuses preuves indirectes basées sur des études de laboratoire, ce qui ouvre des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certains types de cancer et encouragent la recherche dans ce domaine (Izquierdo Alegre, 2009).

I.1.1.4. Sélection des probiotiques

Une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années ; cependant, les effets attribués à bon nombre de ces produits ne sont pas soutenus par une justification scientifique adéquate (Izquierdo Alegre, 2009).

Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes. Par conséquent, il est nécessaire d'établir des critères rationnels pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'homme avec des essais cliniques contrôlés. L'élucidation des mécanismes à la base des effets santé et nutritionnels attribués aux probiotiques peut aider à associer de façon plus rationnelle ces effets aux bactéries probiotiques, et à choisir les souches ou les mélanges de souches les plus prometteurs à cet égard (Izquierdo Alegre, 2009).

Tableau 4. Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés)

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	- Action de la β -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	- Résistance à la colonisation par des pathogènes - Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	- Modulation de la flore intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	- Assimilation du cholestérol - Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	- Stimulation du système immunitaire - Production de composés antimutagéniques - Modulation des enzymes fécales carcinogéniques - Dégradation de carcinogènes - Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

Il est généralement admis que les effets manifestés par une souche probiotique ne peuvent pas être extrapolés à une autre souche, même si elles appartiennent au même genre et à la même espèce. L'activité probiotique est donc "souche-spécifique", ce qui n'est pas surprenant si l'on considère la grande variété de résultats qui sont obtenus dans les tests in vitro en fonction des souches utilisées et peut être expliqué par des différences métaboliques et physiologiques entre celles-ci (Izquierdo Alegre, 2009).

Il importe de noter que c'est la FAO/OMS (2002) qui a établi des critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques et défini des données nécessaires

à la justification des allégations santé. Le schéma de la figure 2 résume les lignes directrices exposées dans le rapport rendu par ce comité. Il est ainsi recommandé de suivre celles-ci comme préalable à toute allégation concernant un produit probiotique.

Dans un premier temps, les tests *in vitro* sont critiques pour s'assurer de l'innocuité des microorganismes utilisés comme probiotiques. Dans ce sens, le comité recommande, même pour les groupes de bactéries ayant une longue histoire en termes de sécurité d'utilisation (GRAS), une certaine caractérisation des souches pour éliminer la possibilité de résistance aux antibiotiques, d'activités métaboliques nocives (production de D-lactate, déshydroxylation des sels biliaires, etc.), de production de toxines d'activité hémolytique, ou d'effets secondaires particuliers (FAO/WHO, 2002). Les critères de sélection des probiotiques définis par ces deux organisations internationales sont indiqués au tableau 5.

I.1.2. Les prébiotiques

I.1.2.1. Définition du concept « prébiotique »

Le concept prébiotique est lié au développement des aliments fonctionnels depuis les années 1990. La première définition officielle a été proposée par Gibson et Roberfroid en 1995: Un prébiotique est « une substance non digestible qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon ».

Un composé prébiotique doit par conséquent répondre aux trois conditions suivantes :

- Arriver intact dans l'intestin (au moins en partie)
- Etre le substrat privilégié de certains types de bactéries du colon
- Orienter le métabolisme de la flore du colon dans un sens bénéfique pour la santé de l'hôte.

Comparés aux probiotiques qui introduisent des bactéries exogènes, les prébiotiques modulent les bactéries endogènes, c'est-à-dire la composition de l'écosystème naturel, en

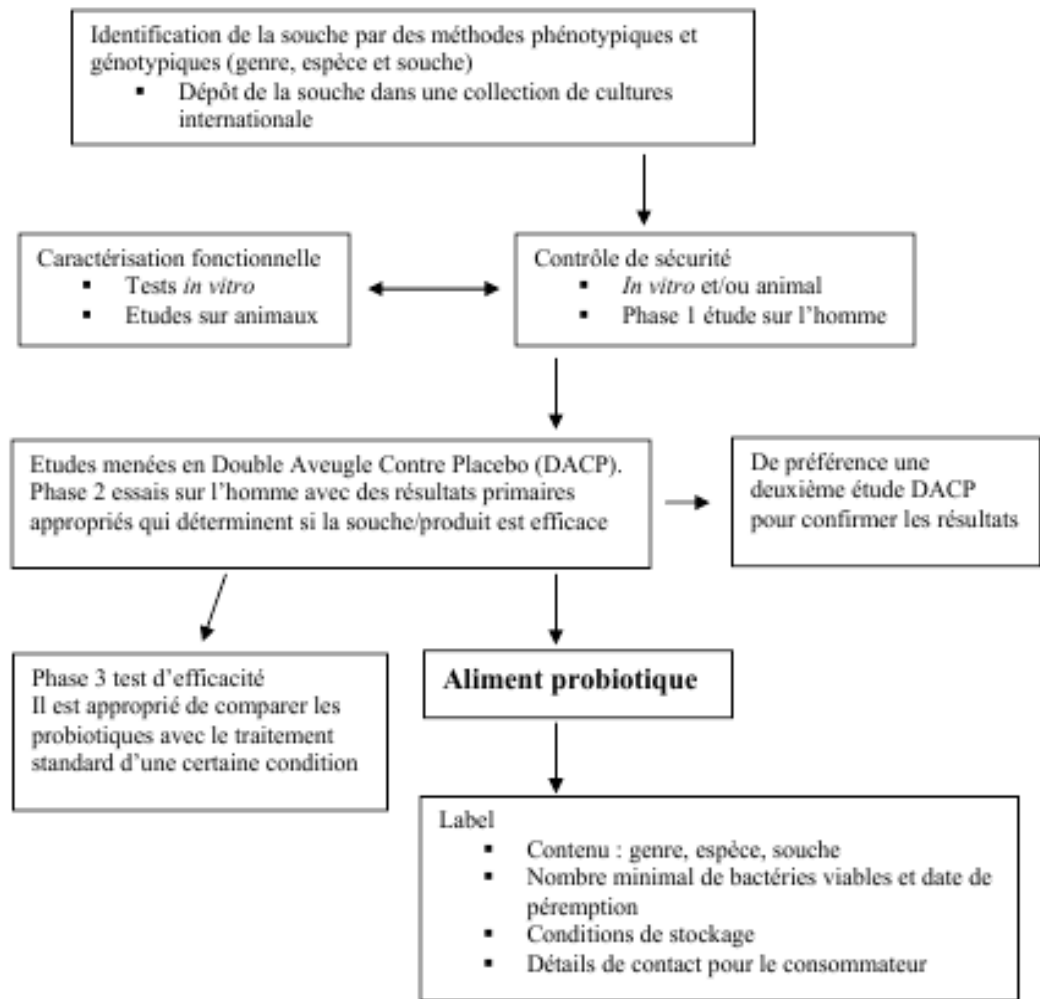


Figure 2 : Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (FAO/WHO, 2002)

Tableau 5. Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (FAO/WHO, 2002).

Critères de Sécurité	<ul style="list-style-type: none">• Historique de non pathogénicité (GRAS)• Souche d'origine humaine ou alimentaire• Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques• Souche déposée dans une collection de cultures internationale• Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques• Pas de déshydroxylation des sels biliaires
Critères Fonctionnels	<ul style="list-style-type: none">• Tolérance à l'acidité gastrique• Tolérance à la bile• Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines)• Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus• Stimulation du système immunitaire
Critères Technologiques	<ul style="list-style-type: none">• Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini• Conservation des propriétés probiotiques après production.

I.1.2.2. Caractérisation, innocuité et réglementation des prébiotiques

L'ingrédient prébiotique doit être parfaitement caractérisé. Les produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient doivent être connus et caractérisés, qu'il s'agisse d'un ingrédient isolé d'un produit végétal, animal ou microbien, ou d'un ingrédient produit par synthèse chimique ou microbienne. Les procédés d'obtention doivent être décrits ([AFSAA, 2002](#)).

En outre, les ingrédients prébiotiques étant souvent composés d'un mélange de molécules, les molécules actives doivent être identifiées et caractérisées, et leur concentration dans le produit doit être précisée. Enfin, les microorganismes ciblés par l'ingrédient prébiotique et ses mécanismes d'action devraient aussi avoir été recherchés et précisés autant que possible ([AFSAA, 2002](#)).

Il est à noter que le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) a soulevé le risque d'un éventuel déséquilibre de la balance hydrominérale induit par les prébiotiques. Les études réalisées chez des nourrissons recevant une préparation lactée contenant un mélange de fructo-oligosaccharides (FOS) et de galacto-oligosaccharides ou gluco-oligosaccharides (GOS), à la dose de 0,8 g/100 ml de produit reconstitué montrent que les selles sont plus molles, suggérant ainsi une augmentation de l'excrétion d'eau ([Moro et al, 2002](#)).

Dans un premier avis en date du 26 septembre 2001, le CSAH concluait qu'il n'y avait pas assez de données pour établir l'innocuité des FOS et des GOS comme ingrédients dans les préparations pour nourrissons et appelait à de nouvelles études sur les effets indésirables potentiels de ces ingrédients, en particulier sur la balance hydrique et la biodisponibilité des micronutriments ([AFSAA, 2002](#)).

Dans un deuxième avis en date du 13 décembre 2001, le CSAH affirmait, au vu de 4 études cliniques dont les résultats étaient disponibles depuis la date du premier avis, qu'il n'y avait pas d'indication d'effets indésirables avec des préparations pour nourrissons et de suite contenant jusqu'à 0,8 gramme/100 mL de produit prêt à l'emploi d'un mélange FOS-GOS dans une proportion de 10%-90% ([AFSAA, 2002](#)).

I.1.2.3. Nécessité de l'indigestibilité du prébiotique pour l'homme

La définition des prébiotiques inclut les caractères « non digestibilité » et « fermentescibles ». Les prébiotiques avérés à ce jour, sont tous des glucides et la plupart possède un faible degré de polymérisation, à l'exception des amidons résistants.

Une influence de la structure chimique a été rapportée pour les pectines dont l'utilisation par des souches pures bactériennes, est affectée par les degrés de polymérisation et de méthylation (Olano-Martin et al, 2002).

La structure chimique des fructanes semble également affecter leur vitesse de fermentation par la flore intestinale totale (Smiricky-Tjardes et al, 2003) mais n'altérerait pas l'intensité de la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) qui en résulte (Rycroft et al, 2001). Inversement, dans le cas d'oligo-xylosides, la présence et la nature des ramifications affecteraient à la fois la vitesse de fermentation et la quantité totale 'd'AGCC produits (Kabel et al, 2002).

Vu la configuration β de l'anomère C₂ dans les monomères fructose, les fructanes de type inuline résistent à l'hydrolyse par les enzymes digestives de l'homme, spécifiques des liaisons α -glycosidiques; par conséquent ces composés atteignent le côlon intacts d'où le terme « oligosaccharides non digestibles » (Roberfroid, 2005).

Certains prébiotiques augmentent, d'une façon modérée, la teneur en eau des selles chez l'adulte. Cet effet est dû à deux mécanismes : le premier est lié à l'augmentation de l'excrétion de biomasse, elle-même riche en eau, le second est lié au pouvoir osmotique de ces prébiotiques. L'effet sur l'excrétion d'eau dépend donc principalement de la taille moléculaire des glucides prébiotiques et de la dose consommée. A l'inverse, la stimulation de la production d'AGCC par ces prébiotiques augmente l'absorption d'eau par le côlon, ce qui pourrait limiter le risque de déshydratations au cours de la diarrhée.

I.1.2.4. Sécurité d'emploi des prébiotiques

À la connaissance du groupe de travail AFSSA , un seul cas d'accident allergique a été rapporté avec l'ingestion d'inuline chez un sujet adulte (Gay-Crosier et al, 2000). Ce groupe de travail n'a trouvé aucun élément indiquant un risque particulier lié à l'utilisation de glucides indigestibles, sans contaminants protéiques, chez l'adulte et chez l'enfant. De la même façon, aucune donnée n'a été trouvée suggérant un risque d'accident allergique avec des probiotiques.

Chez les nourrissons à risque allergique élevé (antécédents familiaux), il est conseillé de retarder la diversification alimentaire jusqu'à l'âge de 6 mois. L'introduction de prébiotiques ou symbiotiques dès la naissance nécessiterait de mettre en place un suivi spécifique pour ces nouveau-nés à risque (AFSAA, 2002).

Par ailleurs, certains prébiotiques sont des glucides indigestibles de petite taille moléculaire (disaccharides ou oligosaccharides) qui pourraient induire à forte dose une diarrhée osmotique. La concentration de ces ingrédients dans les préparations doit donc être limitée de façon à ce qu'une consommation maximale de préparation apporte une quantité de prébiotiques nettement inférieure (valeur de sécurité) à la valeur déclenchant une diarrhée.

La concentration des prébiotiques dans les préparations de suite doit être raisonnée en prenant en compte la présence possible d'autres substrats indigestibles dans la préparation (émulsifiants, colloïdes, sucres-alcools édulcorants, fibres, etc.) et dans l'alimentation de l'enfant (AFSAA, 2002).

Enfin, des symptômes d'inconfort intestinal, principalement dû à un excès de flatulences quelquefois associé à des ballonnements et/ou des crampes abdominales, ont été rapportés par des sujets adultes lors de la consommation de certains prébiotiques.

L'effet dépend de la nature du prébiotique (les courtes chaînes semblant moins bien tolérées), de la dose ingérée, du mode de consommation (la prise isolée en dehors d'un repas favorisant les symptômes), et aussi de l'individu, certains sujets étant plus sensibles que d'autres. L'origine de cette différence pourrait provenir du profil bactérien des sujets et de leur capacité à produire des gaz (AFSAA, 2002).

L'effet des prébiotiques sur la production de gaz et le confort intestinal des enfants est mal caractérisé. Une étude a montré que la production de gaz chez les nourrissons était fortement influencée par l'alimentation, les enfants nourris au sein étant plus fortement producteurs d'hydrogène que ceux recevant des préparations, mais plus faiblement producteurs de gaz sulfurés (Jiang et al, 2001).

La possibilité d'un inconfort intestinal chez des enfants, lors de la prise de préparations contenant des prébiotiques, devrait donc être considérée par l'industriel. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, aucune restriction d'emploi liée à cette question n'est justifiée.

I.2.1.4. Principaux prébiotiques utilisés par les industries alimentaires

Du fait du métabolisme des bactéries lactiques et des différentes enzymes digestives, les prébiotiques ne peuvent pas être de nature protéinique ou lipidique mais plutôt glucidique (Cummings and MacFarlane, 2002). La majorité des prébiotiques sont des oligosaccharides (enchaînement de 2 à 20 résidus de pentose ou d'hexose) (tableau 7) (Franck, 2002).

Tableau 6: Exemples de composés prébiotiques commercialisés (Franck, 2002)

PREBIOTIQUES	NOM	STRUCTURE	FOURNISSEUR
Oligo-fructoses	Raftilose [®]	Fru-Fru _n + Glc-Fru _n	Orafti (Belgique)
Fructo-oligosaccharides	Actilight [®]	Glc-Fru _n	Beghin Meiji Industries (France)
Galacto-oligosaccharides	Oligomate [®]	Glc-Galn	Yakult (Japon)
Lactulose	MLS-50 [®]	Gal-Fru	Morinaga (Japon)
Oligo-saccharides de soja	Soya-Oligo	Galn-Glc-Fru	Calpis (Japon)
Isomalto-oligosaccharides	IMO 900	Glc _n	Showa Sangyo (Japon)
Gluco-oligosaccharides	Bioecolia [®]	Glc _n	Solabia (France)

I.2.1.4.1. L'inuline et les fructo-oligosaccharides (FOS).

I.2.1.4.1.1. Structure, obtention et utilisation.

L'inuline et les fructo-oligosaccharides sont des fructanes de type β (2-1) (fig.3) qui se trouvent en quantité appréciable dans la nature. Ils sont présents chez une grande variété de plantes y compris les céréales, les légumes et les fruits : blé, asperge, oignon, ail, poireau, artichaut et banane.

Etant donné leur teneur élevée en inuline, le topinambour, le dahlia et la chicorée étaient au départ envisagés pour la production industrielle d'inuline mais pour diverses raisons, les racines de chicorée ($\geq 70\%$) sont celles les plus utilisées (Roberfroid, 2005).

Les oligo-fructoses ou fructo-oligosaccharides (FOS) peuvent être obtenus à l'aide de deux procédés de fabrication distincts ; par hydrolyse enzymatique partielle de l'inuline de chicorée (Orfati, Belgique) éventuellement suivie d'un séchage par atomisation, tandis que Meiji Seika (Japon) et Bghin-Meiji industries (France), les synthétisent à partir de saccharose en recourant à une fructosyl-transférase (Bornet, 1994).

L'inuline ou l'oligo-fructose peuvent être utilisés, soit pour leurs avantages nutritionnels, soit pour leur propriétés technologiques (gélifiant, liants, principaux ingrédients des préparations allégées). Ils sont de plus utilisés spécifiquement dans les aliments fonctionnels comme ingrédients prébiotiques stimulateurs du développement des bactéries intestinales bénéfiques (Ziar et al, 2013).

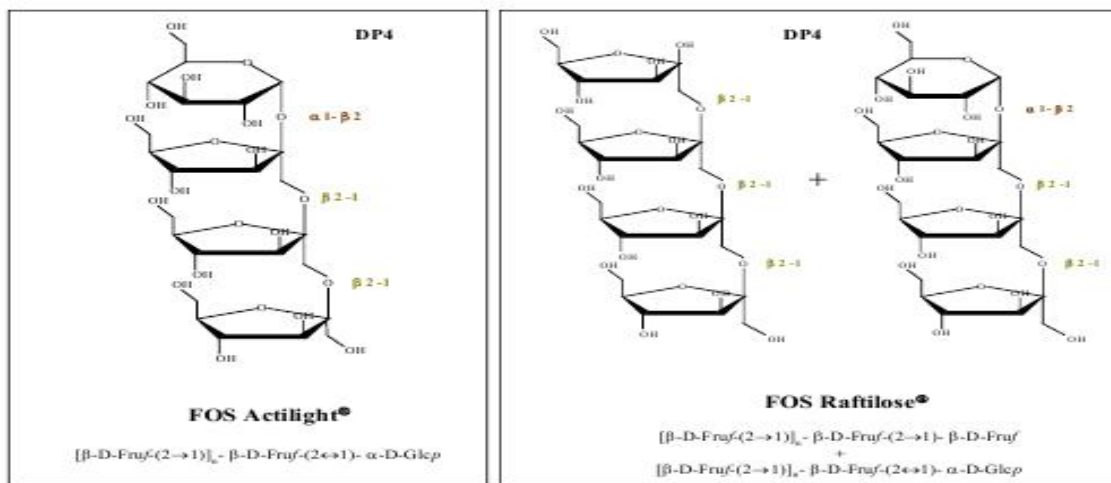


Figure 3: Structure des FOS Actilight et des FOS Raftilose (Izquierdo Alegre, 2009)

I.2.1.4.1.2. Effet des « FOS » sur la santé

Beaucoup d'études, notamment *in vitro*, ont été effectuées avec les FOS et en particulier des fermentations *in vitro* sur des souches isolées et qui ont montré que 7 souches sur 8 de bifidobactéries (appartenant aux espèces *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis* et *B. longum*), ainsi que 12 souches sur 16 de lactobacilles (appartenant aux espèces *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* et *Lb. casei*) sont capables de consommer les FOS alors que des souches pathogènes appartenant aux espèces *Escherichia coli* et *Salmonella sp.* ne les hydrolysent pas (Kaplan and Hutkins, 2003).

Des cultures *in vitro* de flore fécale en présence de FOS ont permis la multiplication de souches de bifidobactéries et la production d'acides gras à chaîne courte (Rycroft et al., 2001).

Par ailleurs, Molis et al (1996) ont évalué le devenir des FOS chez 6 volontaires sains qui ont consommé 20 g par jour de FOS répartis en 3 ingestions post-prandiales pendant 11 jours. Des analyses ont été effectuées sur des échantillons iléaux récoltés par intubation et sur des fèces. La quasi-totalité des FOS n'a pas été absorbée dans l'intestin grêle et n'a pas été retrouvée dans les fèces. Les FOS ont donc été fermentés dans le côlon.

D'après une étude de Campbell et al (1997), 20 rats ayant consommé en moyenne 1 g de FOS (correspondant à 6 % (P/P) du repas) par jour pendant 14 jours ont produit une quantité notable d'acides gras à chaîne courte dans le cæcum dont notamment du butyrate, avec un pH plus acide des fèces et une augmentation du nombre de bifidobactéries cæcales.

En outre, Buddington et al (1996) ont évalué les activités de certaines enzymes réductrices impliquées dans la cancérogénèse de 12 hommes sains ayant reçu 4 g de FOS Actilight par jour pendant 25 jours. Les activités fécales de la β -glucuronidase et de l'acide glycocholique hydroxylase ont alors diminué de 75 et 90 %, respectivement.

Enfin, il y a aussi Cherbut et al (2003) qui ont testé l'influence de l'ingestion de FOS chez des rats présentant des colites. Des solutions contenant du FOS ont été administrées directement dans l'estomac via un cathéter pendant 7 à 14 jours afin d'obtenir 1 g de FOS introduit chaque jour. L'ingestion de FOS a augmenté la teneur en bactéries lactiques dans

le cæcum, ainsi que la concentration de lactate et de butyrate. Le score global d'inflammation déterminé par l'aspect du côlon des rats tués a nettement diminué.

I.1.2.1.4.2. Les gluco-oligosaccharides (GOS)

Les GOS α -1,2/ α -1,6/ α -1,4 appartiennent à la famille des glucanes. Ces derniers sont des polymères de glucose liés par différents types de liaisons (α ou β ; 1→4, 1→6, 1→2 ou 1→3) (fig.4). Ils peuvent se trouver à l'état naturel sous forme par exemple d'amidon ou de glycogène jouant un rôle de réserve glucidique (Rousseau, 2004).

Les GOS sont des glucanes de petite taille. Ils sont synthétisés par une réaction de transglucosylation catalysée par des enzymes de la famille des glucane-saccharases (EC 2.4.1.5.). Ces enzymes assurent le transfert d'unités glucosyle provenant du substrat donneur sur le produit accepteur à son extrémité non réductrice. L'oligosaccharide ainsi produit devient alors substrat pour donner un oligosaccharide de degré de polymérisation supérieur.

Les glucane-saccharases acceptent un nombre limité de substrats donneurs (en général du saccharose) mais un nombre variable de produits accepteurs (par exemple glucose ou maltose). Il existe une grande variété de glucane-saccharases qui présentent différentes spécificités et catalysent la formation de différents types de liaisons osidiques (α -(1→2), α -(1→3), α -(1→4) et α -(1→6)) (Rousseau, 2004).

I.2.1.4.2. Le lactulose.

Le lactulose (4-O- β -D-galactosyl-D-fructose) est un disaccharide synthétique dérivé du lactose par isomérisation, produit notamment par Solvay (Pays-Bas) et par Morinaga (Japon), les deux sucres qui le composent sont liés entre eux par une liaison de type β glycosidique, le rendant ainsi résistant à l'action des enzymes digestives de l'homme.

Le lactulose n'est pas présent dans la nature, il est très soluble dans l'eau, ayant un gout sucré, plus que celui du lactose mais moins que ce lui du fructose (Franck, 2002).

A l'instar de sa qualité laxative, le lactulose n'est pas digéré dans l'intestin grêle de l'homme mais il est fermenté rapidement par la microflore de côlon (Crittenden, 1996)

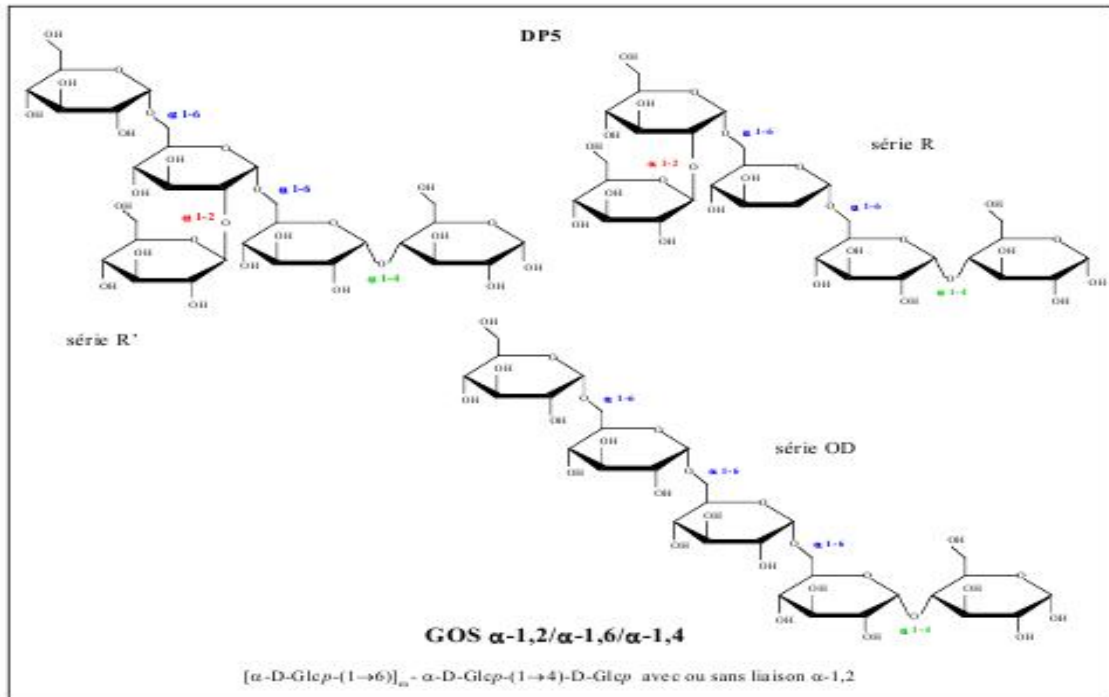


Figure 4: Structure des GOS α -1,2/ α -1,6/ α -1,4.

Une étude menée chez l'homme et dans laquelle le lactulose était administré à la dose de 20g/L/j pendant 4 semaines, a montré un accroissement significatif du nombre de bifidobactéries et des lactobacilles, alors que les populations de clostridies et de coliformes étaient diminuées (Ballongue et al, 1997).

Le lactulose a également permis de réduire l'incidence de la translocation bactérienne chez des rats souffrant d'infections intestinales (Ozasla et al, 1997) et de diminuer le nombre de foyers de cryptes aberrantes (lésions pré-néoplasiques) dans le colon des rats, lorsqu'il a été ingéré en combinaison avec des bifidobactéries (*B. longum*) (Challa et al, 1997).

Le lactulose est essentiellement utilisé comme produit pharmaceutique, son utilisation des les produits alimentaires pourrait être autorisé à l'avenir (Franck, 2002).

I.2.1.4.3. Autres prébiotiques

De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation prébiotique, certains oligosaccharides sont au moins partiellement hydrolysés et absorbés dans l'appareil gastro-intestinal supérieur : xylo-oligosaccharide, isomalto-oligosaccharides (Tuohy et al, 2005) féruloyl—oligosaccharides (Yuan et al, 2005). Certains amidons résistants et des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotiques.

Le lactose, qui échappe à la digestion dans l'intestin grêle de l'enfant, est également un prébiotique, et plusieurs travaux ont montré que le lactose pouvait parvenir dans le colon chez le nourrisson (Kien, 1996).

Afin de mettre en évidence la capacité à se comporter en tant que prébiotique et à stimuler de façon sélective la croissance de bactéries intestinales bénéfiques, différents modèles in vitro ainsi que des expériences sur des animaux, peuvent donner des indications préliminaires, mais la sélectivité de la fermentation dans l'écosystème complexe du milieu intestinal est requise et doit cependant, toujours être confirmée par des études avec des volontaires humains (Roberfroid, 2005).

I.2. Généralités sur le caroubier.

I.2.1. Étymologie et taxonomie.

Le nom scientifique du caroubier, *Ceratonia siliqua* L. dérive du grec Keras (= corne) et du latin siliqua désignant une silique ou gousse et faisant allusion à la dureté et à la forme du fruit, il est connu aussi sous le nom de pain de St. Jean-Baptiste (Battle et Tous, 1997). Par ailleurs, le nom dialectal kharouv, originaire de l'hébreu, a donné lieu à plusieurs dérivés tels que Kharroub en arabe, algarrobo en espagnol, carroubo en italien, caroubier en français, etc.... Cette espèce appartient au genre *Ceratonia* de la sous-famille des *Caesalpinioïdæ*, de la famille des *Fabaceae* (Légumineuses), qui fait partie de l'ordre des *Fabales* (Rosales), Classe des *Magnoliopsida* (Quezel et Santa, 1962).

Certains auteurs ont désigné *Ceratonia* comme étant l'un des genres les plus archaïques des légumineuses (Tucker, 1992) et qui serait complètement isolé des autres genres de sa famille (Zohary, 1973).

I.2.2. Caractères biologiques.

Le caroubier est un arbre ou arbuste sclérophylle, sempervirent, qui peut atteindre 7 à 20 m de hauteur et une circonférence à la base du tronc de 2 à 3m (Figure1). Il a une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune ; et brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur. Le caroubier peut vivre jusqu'à 200 ans (Ait Chitt et al., 2007).

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

Par conséquent le semis donne des plants avec un ratio de 50% de femelles et 50% des mâles improductifs (Ait Chitt et al., 2007).

Ce rapport est modifié par greffage et bouturage (Gharnit et al., 2004) et il existe quelques formes hermaphrodites (Romano et al., 2002). Les feuilles persistantes, de 10 à 20 cm long, se caractérisent par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm, elles sont coriaces, entières, ovales à elliptiques, paripennées, légèrement échancrées de couleur verte (Ait Chitt et al., 2007).

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 (Batlle et Tous, 1997). Les fleurs femelles sont constituées d'un pistil court et recourbé avec un petit ovaire (5 à 7mm) bicarpellé.

Les stigmates sont bilobés et couvertes 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). La floraison apparaît en hiver, sur le vieux bois.

Le développement du fruit est très long. Pour arriver à maturité en été, il met généralement entre 9 et 10 mois. Il est de grande taille : de 10 à 20 cm de longueur, et de 2 à 3 cm de largeur. Il est vert puis brun, et, au moment de la maturité, brun foncé à noir (fig.5). Il est sinueux sur les bords, aplati et présente un tissu pulpeux, sucré, rafraîchissant renfermant de 12 à 16 graines brunes soit 10 à 20 % du poids de la gousse en fonction de cultivar et du climat (Rejeb, 1995).



Figure 5 : Aspect du fruit mûr du caroubier

I.2.3. Ecologie et répartition géographique :

Le caroubier, dont l'aire de répartition s'étend dans les secteurs des plateaux et en moyennes montagnes jusqu'à 1700 m d'altitude, est indifférent à la nature du substrat ; il tolère les sols pauvres, sableux, limoneux lourds, rocaillieux et calcaires, schisteux, gréseux et des pH de 6,2 jusqu'à 8,6 ; mais il craint les sols acides et très humides (Sbay et Abrouch, 2006; Zouhair, 1996). Il s'adapte à plusieurs types de sols à l'exception des sols hydromorphes et salés et les croûtes schisteuses. On le rencontre sur sols marneux, sur sols pauvres superficiels et rocaillieux calcaires, sur des pentes rocheuses, des escarpements peu accessibles et des collines incultes (Nabli, 1989).

C'est une espèce typique de la flore méditerranéenne, bien définie dans l'étage humide, subhumide et semi- aride. Il croît généralement à l'état disséminé dans l'étage du thuya et du

génévrier de Phénicie, dans les peuplements de chêne vert et en association avec *Olea europea* et *Pistacia lentiscus* (Rejeb et al., 1995).

La sécheresse cyclique a révélé que le caroubier résiste mieux au manque d'eau que le chêne vert, le thuya et l'oléastre qui lui sont associés. C'est une essence très plastique, héliophile, thermophile, très résistante à la sécheresse (200 mm/an). Il joue un rôle important dans la protection des sols contre la dégradation et l'érosion et dans la lutte contre la désertification (Zouhair, 1996).

Les études de Rejeb (1995) confirment que le caroubier se comporte comme une véritable espèce résistante à la sécheresse en s'adaptant morphologiquement et physiologiquement au manque d'eau.

Les principales adaptations peuvent se résumer comme suit :

- les stomates sont situés sur une seule face,
- le nombre de stomates est assez élevé et ils sont de petite taille,
- le système racinaire est développé,
- un dépôt de cire important,
- l'assimilation et les échanges gazeux dépendent de l'état hydrique général.

De par ses aptitudes d'adaptation aux stress du sol et du climat, le caroubier pourrait contribuer au développement des zones défavorisées (Gharnit et al., 2006).

Originnaire du Moyen-Orient, le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen d'importance écologique, industrielle et ornementale indiscutable (Hariri et al., 2009). On le rencontre à l'état naturel principalement en Espagne, Portugal, Maroc, Grèce, Italie, Turquie, Algérie, Tunisie, Égypte, et Chypre. Il a été introduit aussi en Australie, en Afrique du Sud, aux États-Unis et en Amérique du Sud (Sbay et Abourouh, 2006).

Généralement, la distribution des espèces arborescentes, telle que *C. siliqua* est limitée par des stress liés aux froids (Mitrakos, 1981). Dans les zones basses méditerranéennes (0-500m, rarement 900m d'altitude), le caroubier constitue une essence dominante et caractéristique du maquis des arbres sclérophylles (Folchi Guillen, 1981).

Au Maroc, le caroubier est localisé dans les plaines et les moyennes montagnes du Rif, du Moyen Atlas, du Haut Atlas et de l'Anti-Atlas et dans des bioclimats de type humide, subhumide, semi-aride et aride côtier à variantes chaude et tempérée. Il est souvent en association avec l'olivier, le lentisque, le thuya ou l'arganier. La principale

population spontanée de caroubier est localisée dans les régions situées entre 600 et 1000 m d'altitude, en association avec d'autres espèces forestières et abritées des vents et du froid (Ait Chitt et al., 2007).

En Tunisie, le Caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage, en association avec l'olivier et le lentisque. Il est bien défini dans les étages humide, subhumide, et semiaride supérieur, à variante chaude à tempérée. Dans les conditions naturelles, on le rencontre à l'état sauvage en association avec l'olivier et le lentisque, et en mélange, avec le callitris, mais le défrichage de ces associations, à la faveur des cultures vivrières et des arbres fruitiers, rend cette végétation de plus en plus rare en Tunisie (Rejeb, 1995).

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 *Pistacia Atlantica* dans les étages semi-aride chaud, subhumide et humide, avec une altitude allant de 100m à 1300m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée ; avec une température de 5°C jusqu'à 20°C et une pluviométrie de 80mm à 600mm/an (Rebour, 1968).

I.2.4. Composition chimique et intérêts de la caroube.

La pulpe et les graines sont les deux principaux constituants de la gousse du caroubier et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. Selon plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe dépend, en général, du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (Orphanos et Papaconstantinou, 1969; Vardar et al., 1972; Calixto et Cañellas, 1982; Albanell et al., 1991).

La pulpe est très utilisée soit comme aliment diététique, soit comme remplaçant du chocolat ou encore en alimentation animale. Elle est très riche en sucres (48- 56%), en particulier, sucrose, glucose, fructose et maltose (tableau 8), mais pauvre en protéines (2- 6%) et en lipides (0.4- 0.6%) dont les acides saturés et insaturés sont en proportions égales (Puhan et Wieling, 1996). A partir d'extrait de gousses, cinq acides aminés, en l'occurrence, alanine, glycine, leucine, proline et valine, ont été isolés par Vardar et al., (1972) et deux autres composés, tyrosine et phénylamine, ont été rapporté par

Charalambous et Pacanstantinou (1966). En plus, la pulpe présente également une teneur très élevée en fibre (27- 50%) et une quantité non négligeable en tanins (18- 20%) (Puhan et Wielinga, 1996). Par ailleurs, l'analyse minéralogique, faite par Puhan et Wielinga (1996) sur la pulpe, a révélé une composition (en mg/100g de pulpe) de: K= 1100, Ca= 307, Mg= 42, Na= 13, Cu= 0.23, Fe= 104, Mn= 0.4, Zn= 0.59.

La graine est composée de 30 à 33% d'enveloppe tégumentaire, de 42 à 46% de l'albumen et de 23 à 25% d'embryon (Neukom, 1988). L'enveloppe tégumentaire est considérée comme étant une source naturelle riche en polyphénols qui sont de puissants antioxydants (Makris et Keflas, 2004). L'albumen est essentiellement constitué de gomme ou galactomannanes, qui est un polysaccharide composé de deux unités de sucres, mannose et galactose, dans une proportion de 4:1, peu similaire à la gomme de aguar (*Cyamopsis tetagonolobus*) (2:1) et celle de Tara (*Colosasia esculenta* L.) (3:1).

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

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

I.2.5. Utilisation du caroubier

- L'arbre est utilisé pour le reboisement et la reforestation des zones affectées par l'érosion et la désertification (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).

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

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

La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée surtout en agro-alimentaire (Sbay et Abourouh, 2006); dans la préparation de jus sucrés, 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, 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. 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, cette plante est connue en thérapeutique pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, antidiarrhéique et troubles digestifs (Berrougui, 2007).

D'autres études expérimentales ont démontré le pouvoir bactéricide 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 [Sanchez et al., \(2010\)](#) la caroube est une source bon marché d'hydrates de carbone pour la production de bioéthanol.

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

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

Cette gomme est utilisée dans l'agro-alimentaire comme épaississant connu sous le code normalisé E410, la confiserie, le secteur cosmétique, pharmaceutique et aussi dans les préparations alimentaires diététiques, pour diminuer l'apport alimentaire dans le traitement de l'obésité ; et en cas d'insuffisance rénale chronique, elle retiendra dans le tube digestif, l'urée, la créatinine, l'acide urique, l'ammoniaque et les phosphates provoquant un abaissement important et bénéfique du taux d'urée dans le sang ([Berrougui, 2007](#)). Elle est aussi utilisée dans la fabrication d'un condiment aromatique du Sénégal appelé nététu ([Ndir et al., 2000](#)). Selon [Coit \(1962\)](#), la gomme de caroube est utilisée en imprimerie, photographie, matière plastique, encre et cirage.

La gomme de caroube peut être utilisée comme substitut de la pectine, de la gélatine, comme stabilisateur alimentaire, pour la croissance bactérienne et d'autres applications dans le textile ([Calixto et Canellas, 1982](#)).

En plus de toutes ces vertus, l'étude de [Parrado et al., \(2008\)](#) a démontré que la gomme de caroube, lorsqu'elle est utilisée comme biofertilisant après avoir été transformée en un extrait enzymatique hydrosoluble, exerce une action phyto-hormonale bénéfique et significative sur la croissance de la plante, le nombre de fleurs et le nombre de fruits par plant.

Les autres parties de l'arbre sont aussi exploitées ; en effet, la fleur est utilisée par les apiculteurs pour la production du miel de caroube, alors que les feuilles sont utiles pour l'alimentation des animaux. L'écorce et les racines sont utilisées en tannerie grâce à leur

teneur en tanins. Le bois du caroubier, dur, de couleur rouge, est estimé dans la charbonnerie et la menuiserie ([Hariri et al., 2009](#)).

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

CHAPITRE II.

MATERIELS

ET

METHODES

CHAPITRE II. Matériels et méthodes

II.1. Nature et origine des souches utilisées

Les souches utilisées dans cette expérience sont représentées par les starters du yaourt, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* conditionnées sous forme lyophilisée en un mélange commercialisé sous le nom de ferments CY346 (firme DSM, Australie) et par une souche bifide de référence, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 classée L42 (notée ici BL42) à l'ex Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD) de l'INRA de Jouy-en-Josas (France).

II.2. Origine des gousses et obtention du sirop de caroube

Les gousses mûres de caroube ont été récoltées dans la ville de Mostaganem (à l'ex ITA) . Ces gousses sont ensuite nettoyées, séchées, broyées et conservées à -18°C jusqu'à utilisation.

L'obtention du sirop de caroube a été réalisée selon la méthode décrite par [Carvalho et al \(2011\)](#) et qui consiste en une extraction aqueuse des sucres. Les gousses de caroube broyées sont additionnées d'eau distillée dans un rapport 1/10 (P/V) et portées à une température de 50°C sous agitation modérée (100 tours/min.) pendant 5h à pH neutre dans un incubateur orbital (Infors Unitron HT, Suisse). La suspension est ensuite filtrée sous vide avant d'être centrifugée à 7500g (centrifugeuse Beckman Coulter, Fullerton, USA). Le surnageant est ensuite filtré sur papier Whatman N°1.

II.3. Contrôle de la charge microbienne originelle du sirop

Le contrôle de la charge microbienne originelle du sirop de caroube a été réalisé en déterminant la flore aérobie mésophile totale, les levures et moisissures, les spores et les coliformes totaux dans 10 ml de sirop.

II.4. Pasteurisation du sirop de caroube et choix de concentrations utilisées

Avant son utilisation dans les milieux de culture, le sirop de caroube a été pasteurisé à 60°C pendant 30 min. Il a été utilisé à raison de 5ml, 10ml et 20ml dans les cultures. Ces concentrations ont été choisies en tenant compte des travaux d'[Abi Azar \(2007\)](#) qui avaient utilisé le jus de caroube dans le but de stimuler la coagulation du lait.

II.5. Préparation du lait à fermenter.

Le lait à fermenter utilisé dans notre expérimentation est du lait écrémé reconstitué à 12% (P/V) et ensuite stérilisé par tyndallisation dans un bain-marie à une température de 80°C pendant 30min. l'opération est répétée pendant trois jours consécutifs.

Le sirop de caroube est additionné au lait écrémé aux différentes concentrations retenues à tester et homogénéisé avant ensemencement.

II.6. Conditions et types de cultures envisagées

II.6.1. Les milieux de culture

La composition des milieux de culture ci-après, est donnée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux de cultures préparés (bouillons ou gélose) sont autoclavés à 121°C/15 min.

II.6.1.1. Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) :

Peptone	10g
Extrait de viande de bœuf	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1.0 ml
hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4)	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0.2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté ($MnSO_4$, $4H_2O$)	0.05 g
H_2O	1000ml
pH	6.5±0.2

La mise en culture des bactéries lactiques a été faite dans le milieu MRS liquide. Le même milieu acidifié à pH égal à 5.2 et solidifié par l'ajout de 10g d'Agar-agar, a été utilisé pour

le dénombrement de la souche lactique *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* (Dave et Shah, 1996).

Ce milieu MRS modifié et additionné de 5g de lactose, 0.5g de chlorhydrate de cystéine « MRSL lactosé » est utilisé pour cultiver les bifidobactéries en culture pure.

Dans le cas des cultures mixtes, le milieu sélectif MRS-LP à pH égale à 6,8 est utilisé pour dénombrer les bifidobactéries et qui consiste à ajouter la mixture LP (composée de chlorure de lithium (3g), propionate de sodium (2g) et de l'acide propionique (5ml)) au MRS lactosé et cystéiné (Vinderola et al, 2000).

II.6.1.2. Dilution simple (DS)

Peptone.....	1g
NaCl.....	8.5g
L-cystéine-HCl.....	0.05g
H ₂ O.....	1000ml
pH.....	7.0±0,2

II.6.1.3. Milieu M17

Peptone trypsique de caseine	2,5g
Peptone pepsique de viande.....	2,5g
Peptone papaique de soja	5g
extrait de levure	2,5g
Extrait de viande.....	5g
D-glycérophosphate de sodium	19g
Lactose	5g
acide ascorbique	0.5 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
H ₂ O.....	1000ml
pH	7.1±0.1

II.6.1.4. Milieu ST (*Streptococcus thermophilus* Agar)

Tryptone	10g
Sucrose	5g
Extrait de levure	5g
K ₂ HPO ₄	2g
H ₂ O	1000ml
pH.....	6.8±0.1

après ajustement du pH à 6.8, une solution à 0.5% de pourpre de bromocrésol et 12g d'Agar-agar sont ajoutés au milieu (Dave et Shahe , 1996)

II.6.2. Les conditions de croissance

La souche bifide est conservée à - 60°C dans des tubes Eppendorf contenant 50% de glycérol et 50% de la culture propagée dans le bouillon MRS.

La revivification de la culture de *Bifidobacterium longum* est effectuée 48h avant de commencer chaque expérience, par une série de deux inoculations dans 10ml de MRS-L (MRS avec 5% de lactose) et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO₂ (Anaérocult).

Les bactéries lactiques *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont transférées deux fois dans le bouillon MRS et incubées à 37°C en aérobie.

Le comptage des bactéries lactiques (LAB), *S. thermophilus* et *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*, est réalisé respectivement sur milieu M17 (72h à 37°C) et MRS acidifié (MRS-ac) à pH 5.2 (24h à 42°C). L'incubation des boîtes inoculées est faite en anaérobiose, en utilisant une jarre dans le cas des monocultures ou en aérobie dans le cas de la culture associée LAB. Dans ce dernier cas, le milieu différentiel ST est utilisé à côté du M17 et du MRS-ac, l'incubation est réalisée à 37°C (tableau 8).

Le milieu MRS-L agar a été utilisé pour dénombrer la souche bifide (BL42) en culture pure ou utilisée avec milieu sélectif MRS-LP agar et les trois milieux pour les LAB cités auparavant (M17, MRS-ac et ST) dans le cas de la culture mixte BL42+LAB.

Les boîtes de MRS-L et MRS-LP inoculées sont incubées en anaérobiose pendant 72h à 37°C, alors que les boîtes de M17 (72h à 37°C), MRS-ac (24h à 42°C) et ST (24h à 37°C), sont incubées dans des conditions d'aérobiose.

II.6.3. Les différents types de cultures sur milieu lait avec ou sans sirop de caroube

II.6.3.1. Les cultures starters pures

Les cultures starters (*S. thermophilus* et/ou *L. bulgaricus*) de 24h sont collectées des bouillons MRS ; centrifugées et lavées deux fois et ensuite propagées dans le lait écrémé à raison d'une concentration finale approximative de 10^6 UFC/ml.

Des inoculums de 3% ou 5% de chaque monoculture ou culture associée, respectivement, sont propagés individuellement dans des flacons contenant le lait écrémé stérile (témoin) ou le lait additionné de sirop de caroube pasteurisé à 60°C/30min (échantillon) et distribués dans des tubes stériles de 10ml. Ainsi, les tubes de lait sont incubés à 42°C en aérobiose.

II.6.3.2. La culture bifide pure

Les cultures de 24h sont collectées des bouillons MRS-L ; centrifugées et lavées deux fois et ensuite propagées dans le lait écrémé à raison d'une concentration finale approximative de 10^7 UFC/ml.

Des inoculums de 5% de la souche bifide BL42 sont propagés individuellement dans des flacons contenant le lait écrémé stérile (témoin) ou le lait additionné de sirop de caroube (échantillon) et distribués dans des tubes stériles de 10ml. Ainsi, les tubes de lait sont incubés à 37°C en anaérobiose

Tableau 7: différents types de cultures réalisées et conditions de culture.

Cultures bactériennes	Conditions d'incubation	Milieux utilisés
<i>S. thermophilus</i> (culture pure)	72h à 37°C en anaérobiose	M17
<i>L. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> (culture pure)	72h à 43°C en anaérobiose	MRS-ac
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> (culture associée)	48h à 37°C aérobiose 24h à 37°C en aérobiose	M17+ MRS-ac ST
Bifidobactérie L42 (culture pure)	72h à 37°C en anaérobiose	MRS-L
Bifidobactérie L42 (cultures mixtes avec St et/ou Lb)	72h à 37°C en anaérobiose 24h à 37°C en aérobiose 72h à 43°C en anaérobiose	MRS-L+MRS-LP ST+M17 MRS-ac

II.6.3.3. Les cultures associées « starters + bifidobactérie »

Les cultures associées (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *Bifidobacterium longum* ou *S. thermophilus* + *Bifidobacterium longum* ou *L. bulgaricus* + *Bifidobacterium longum*) de 24h sont collectées des bouillons MRS ou MRS-L, centrifugées et lavées deux fois et ensuite propagées dans le lait écrémé à raison d'une concentration finale approximative de 10^6 à 10^7 UFC/ml.

Des inoculums de 3% composés de : *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* et/ou *S. thermophilus*, ajoutée (s) dans un rapport de 1 à la souche bifide, sont propagés individuellement dans des flacons contenant le lait écrémé stérile (témoin) ou le lait additionné de sirop de caroube (échantillon) et distribués dans des tubes stériles de 10ml. Ainsi, les tubes de lait sont incubés à 37°C en aérobiose.

II.7. Détermination de la cinétique de croissance

Un échantillon de 1ml est pris avant le démarrage de la fermentation (0h), puis à chaque 2h d'intervalle pendant la fermentation pour déterminer la quantité de biomasse bactérienne, exprimée en Log UFC/ml. 1 ml de chaque lait fermenté par culture pure ou mixte est dilué avec 9ml d'une solution stérile de DS.

Le nombre de cellules visibles est calculé après une série de dilutions décimales adéquate dans la solution DS (0,1% eau peptonée additionnée de cystéine-HCl). Les échantillons sont homogénéisés par agitation vigoureuse de plus de 15s au minimum en utilisant un vortex (Heidolph ; Bioblock Scientific, type REAX 2000, Allemagne). De chaque dilution, un aliquote de 100ul est étalé sur milieu approprié.

Les colonies appropriées sont dénombrées par compteur type GALLENKAMP (UK).

Les vitesses spécifiques et maximales de croissance ($\mu_{\max}/\Delta t$) de chaque culture bactérienne pure ou mixte, additionnée ou non de sirop de caroube ; sont calculées selon l'équation donnée par [Desjardins et al \(1991\)](#) :

$$\mu_{\max}/\Delta t = (\ln X_2 - \ln X_1) / t_2 - t_1$$

II.8. Détermination de la cinétique d'acidification

Un échantillon de 10 ml est recueilli avant le démarrage de la fermentation (0h), puis à chaque 2h d'intervalle pendant la fermentation pour la mesure du pH (wtw, pH-mètre 330, Weilheim ; Allemagne).

Les vitesses maximales d'acidification ($\Delta \text{pH}_{\max} / \Delta t$) de chaque culture bactérienne pure ou associée, additionnées ou non de sirop de caroube ; sont calculées selon l'équation donnée par [Desjardins et al \(1991\)](#) :

$$\Delta \text{pH}_{\max} / \Delta t = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2) / t_2 - t_1$$

Où pH_1 et pH_2 sont les valeurs de pH enregistrées aux temps t_1 et t_2 de la phase exponentielle, respectivement.

La post-acidification des laits fermentés entreposés à 4°C a été suivie par la mesure hebdomadaire du pH pendant 28 jours.

II.8. Détermination de la survie des souches dans le lait fermenté entreposé à 4°C

Un aliquot de 100µl de lait fermenté est dilué au 1/10 dans une solution stérile de DS (0,1% peptone P/V) afin d'obtenir une dilution adéquate permettant le dénombrement.

Le nombre de cellules viables, déterminé 3 fois est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu adéquat et exprimé en Log UFC/ml. La première analyse s'est effectuée 24h après la fin de fermentation (analyse j1).

Le taux de survie est calculé selon l'équation donnée par [Ustinol et Gandhi \(2002\)](#) :

$$\text{Viabilité}\% = (\text{UFC à la nième semaine(s) d'entreposage} - \text{UFC initial}) \times 100$$

II.9. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANNOVA) en utilisant le logiciel Stat box version 6.4 (1999).

La comparaison des moyennes a été réalisée par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. A $P < 0.05$, la différence est considérée comme significative.

CHAPITRE III.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION.

III.1. Effets du sirop de caroube sur le comportement fermentaire des souches.

Le contrôle de la charge microbienne originelle du sirop préparé a indiqué l'absence de spores et de coliformes totaux, ainsi qu'un niveau de levures, moisissures et flore aérobie mésophile totale faible (< 1 UFC/ml)

III.1.1. Effet du sirop de caroube sur la cinétique de croissance

III.1.1.1. Effet sur la croissance des starters du yaourt.

A partir d'une biomasse initiale de l'ordre de 7.5 log UFC/ml, les deux bactéries lactiques se développent lentement sur milieu lait (fig. 6 et 7).

En absence de sirop de caroube, la biomasse de *L. bulgaricus* évolue lentement et n'affiche pas une allure exponentielle mais dessine plutôt une courbe de faible pente. L'addition de 5% de sirop de caroube au lait n'améliore pas significativement la croissance de cette souche qui peine encore à croître (fig. 6).

En revanche, lorsque le sirop de caroube est additionné au taux de 10%, la biomasse de la souche *L. bulgaricus* augmente sensiblement par rapport au témoin (absence de sirop de caroube) et affiche un gain de plus 1 logUFC/ml en 6h de fermentation (fig.6).

Le développement de la souche *Streptococcus thermophilus* s'effectue de la même manière que celui de *L. bulgaricus*. Cette souche n'affiche pas, également, une croissance exponentielle nette et franche au cours des 6h de fermentation ; et ceci, quelque soit le laitensemencé (indépendamment de la présence ou de l'absence de sirop de caroube).

La biomasse des streptocoques augmente certes, mais d'environ 0.5 log UFC/ml seulement en absence de sirop de caroube. L'effet de l'addition du sirop de caroube au lait est, cependant, perceptible au taux de 10% puisque cette biomasse augmente de 1 logUFC/ml après 6h de fermentation (fig.7).

Les gousses de caroube sont riches en sucres. Le sucrose représente 65 à 75% du total des sucres présents ; alors que le glucose et le fructose constituent 15 à 20% des sucres totaux (Petit et Pinilla, 1995).

La teneur en sucres de l'extrait aqueux de gousses de caroube dépend de plusieurs paramètres tels que la taille des particules après broyage, le rapport entre particules de

gousses et l'eau comme solvant d'extraction, du temps et de la vitesse d'agitation, et enfin de la température à laquelle est faite l'extraction (Petit et Pinilla, 1995).

Par ailleurs, l'eau extrait non seulement les sucres mais aussi les composés phénoliques et les tannins solubles qui, en principe, sont des inhibiteurs de microorganismes.

Ainsi, il est souvent nécessaire de purifier les extraits aqueux de sucres de gousses de caroube pour obtenir un sirop exempt de tannins solubles. La simple filtration serait probablement insuffisante pour assurer cette purification qui nécessiterait l'utilisation de résines anioniques (Petit et Pinilla, 1995).

S. thermophilus a une grande affinité pour le substrat lactose du lait qui est le disaccharide de choix pour la majorité des souches appartenant à cette espèce (Giraffa et al, 2001). C'est une souche texturante, aromatique et douée d'une très bonne activité protéolytique et, elle croit lentement comparativement à la souche *L. bulgaricus*.

L'effet stimulateur de la croissance des starters du yaourt par le sirop de caroube utilisé à 10% aurait vraisemblablement été plus prononcé si les extraits préparés avaient subi une purification appropriée.

Les quantités de biomasse atteintes sont de l'ordre de 8.8 log UFC/ml pour la souche *Lactobacillus bulgaricus* et de 8.7 log UFC/ml pour la souche *Streptococcus thermophilus*.

D'autres « sweeteners » ont fait l'objet d'essais d'amélioration de la croissance de souches lactiques. C'est ainsi que Chick et al (2001) avaient constaté que le miel de trèfle, le sucrose ou le fructose, favorisent tous d'une manière similaire la croissance de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus*.

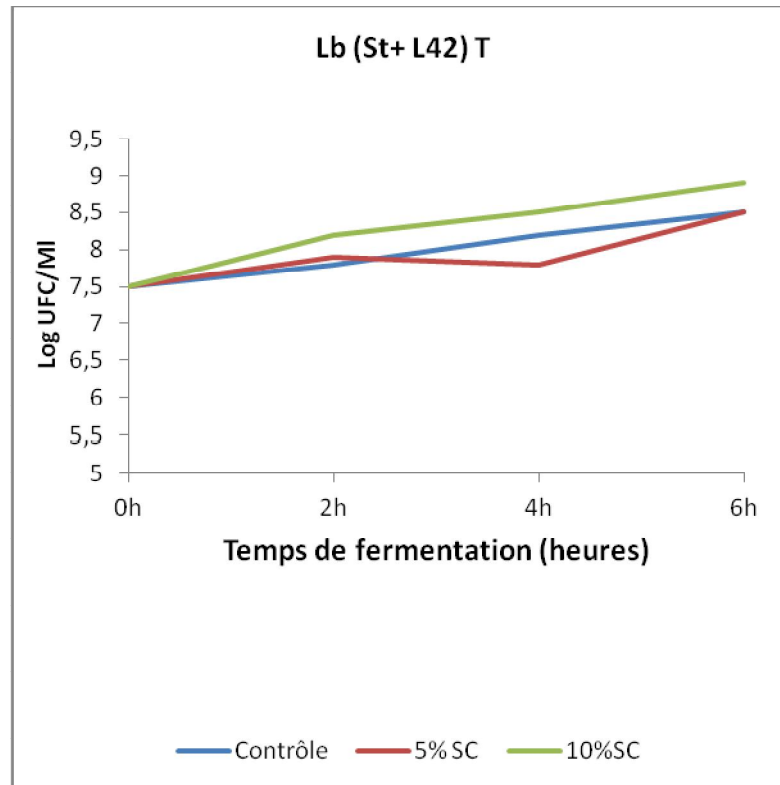


Figure 6 : Cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* en présence de *Streptococcus thermophilus* et de la souche bifide BL42 au cours de la fermentation du lait à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

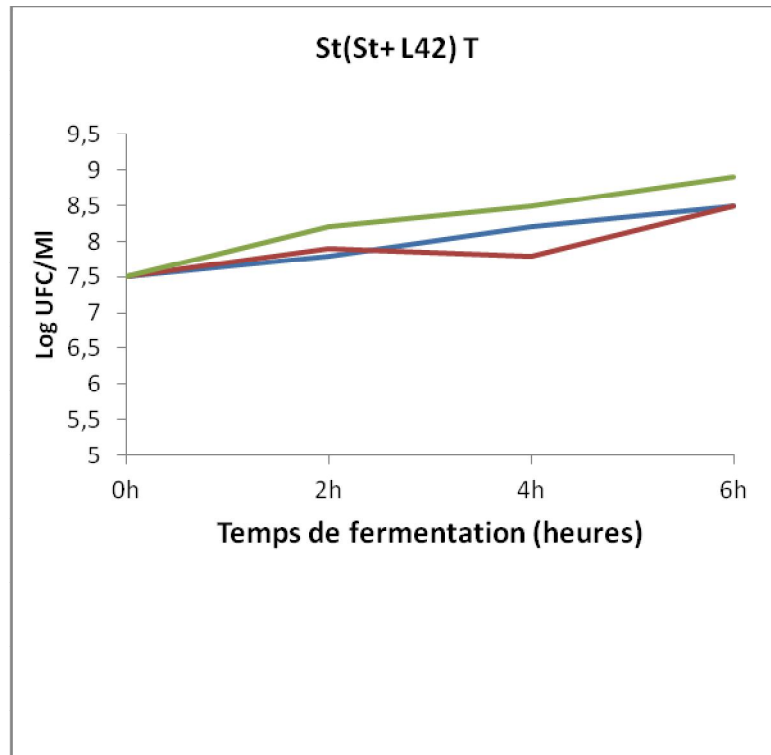


Figure 7 : Cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* en présence de *Lactobacillus bulgaricus* et de la souche bifide BL42 au cours de la fermentation du lait à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

De même, [Riazi et Ziar \(2008, 2010, 2012\)](#) ont rapporté l'effet stimulateur du miel sur la croissance de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* et de souches bifides en cultures associées.

III.1.1.2. Effet sur la croissance de *Bifidobacterium longum* BL42.

Les essais de culture pure de *Bifidobacterium longum* BL42 sur milieu lait ont mis en évidence l'incapacité de cette souche à se développer dans un tel environnement.

Dans la présente expérience, il a été constaté que la souche bifide BL42 cultivée seule affiche un accroissement très faible de sa biomasse, et qu'elle n'entame sa faible croissance qu'après 6 heures de latence dans son développement avec une biomasse égale à 7,7 log UFC/ml.

Cette lenteur dans sa croissance persiste même après 8h de fermentation où la biomasse accumulée ne dépassait guère 7.5 log UFC/ml et il aura fallu 12h d'incubation supplémentaire pour atteindre la coagulation.

Ces observations nous ont amené à n'envisager que la culture de cette souche bifide en association avec les starters du yaourt, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, pour rester dans les normes temporelles d'obtention de la coagulation du lait par fermentation.

Ces bactéries restent sensibles à l'acidité du lait qui peut être générée par l'activité des starters du yaourt. Les bifidobactéries survivent très mal à pH inférieur à 4.5, et certains auteurs (Shah, 1997) suggèrent des pH supérieurs à 4.6 pour qu'elles se maintiennent en vie.

Par ailleurs, généralement, les bifidobactéries sont également sensibles à l'oxygène car il s'agit de bactéries anaérobies strictes dont certaines espèces ont été observées supporter de faibles tensions en oxygène (10 mm de mercure) et s'accommoder ainsi dans des atmosphères micro aérées (Simpson et al., 2004).

Dans la pratique, la culture de ces bactéries exige un abaissement du potentiel d'oxydoréduction du milieu que l'on obtient en y additionnant de la cystéine (Nebra et al., 2002).

La souche *Bifidobacterium longum* BL42 en coculture avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* affiche également une phase de latence assez longue qui dure presque 4h.

En effet, dans cette coculture, et partant d'une biomasse initiale de 7 log UFC/ml, la souche bifide BL42 se développe très lentement et très peu sur le lait en affichant une augmentation de biomasse de l'ordre de 0,3 à 0,5 unité log après 4h de fermentation (fig.8).

Ce constat n'est pas surprenant chez le genre *Bifidobacterium* dont le faible potentiel de croissance sur milieu lait est connu (Rasic et Kurman, 1983 ; Dubey et Mistry, 1996).

L'addition du sirop de caroube au milieu de fermentation provoque un changement dans le comportement de la souche *Bifidobacterium longum* BL42.

En effet, cette souche montre une croissance nette par rapport au témoin (absence de sirop de caroube) à partir de la 4^{ème} heure de fermentation en présence de sirop de caroube (fig.8).

La quantité de biomasse atteinte en fin de fermentation par la souche bifide BL42 est de l'ordre 8,3 log UFC/ml lorsqu'elle est cultivée en présence de 5% de sirop de caroube (fig. 8).

Cette observation indique que le sirop de caroube apporte un complément alimentaire (sucres) qui arrive à stimuler la croissance difficile de cette bifidobactérie en association avec des bactéries bien adaptées à l'environnement lait, telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

L'augmentation de la concentration du sirop de caroube à 10% dans le lait arrive à « booster » un peu plus la croissance de *Bifidobacterium longum* BL42 en coculture avec les starters du yaourt sur milieu lait.

En effet, en présence de 10% de sirop de caroube dans le lait, la quantité de biomasse est encore améliorée et est plus élevée que celle observée avec 5% de concentration. Un niveau de biomasse bifide de 8,8 log UFC/ml a été enregistré; ce qui représente une augmentation de la biomasse initiale de plus de 25% (fig. 8).

Des résultats analogues ont été rapportés par d'autres études ayant utilisé le miel comme ingrédient stimulateur de la croissance de souches appartenant au genre *Bifidobacterium* (Chick et al., 2001; Ustunol et Gandhi, 2001; Ustunol, 2005; Riazi et Ziar, 2008; 2010 et 2012).

III.1.2. Effet du sirop de caroube sur la cinétique d'acidification.

III.1.2.1. Cas des starters du yaourt.

A l'instar de la majorité des espèces appartenant à la famille des lactobacilles, la souche *L. bulgaricus* étudiée produit une quantité d'acide lactique acceptable ($\Delta\text{pH} / \Delta\text{T}$ égal à 0.28h^{-1}).

Le pH du lait passe de 6.35 à 4.65 après 6 heures de fermentation. Le temps nécessaire pour avoir la texture recherchée a été estimé à 4 heures et 30 minutes correspondant à une valeur de pH de 4.73 (fig. 9).

La cinétique d'acidification du lait par *S. thermophilus* était différente. Il semble que la croissance lente de cette souche conduit nécessairement à la production de faibles quantités d'acide lactique ($\Delta\text{pH} / \Delta\text{T}$ égal à 0.026h^{-1}).

Globalement, le pH s'est maintenu au dessus de la valeur de 6 pour finir à afficher 6.19 après 6 heures de fermentation, ce qui signifie que la souche étudiée ne présente pas un pouvoir acidifiant intéressant.

Les résultats de Chamba et Prost (1989) et de Chamba (1990) ont montré qu'une souche n'est acidifiante que si la diminution du pH équivaut à au moins 0.5 unité en quatre heures pour *Streptococcus thermophilus*.

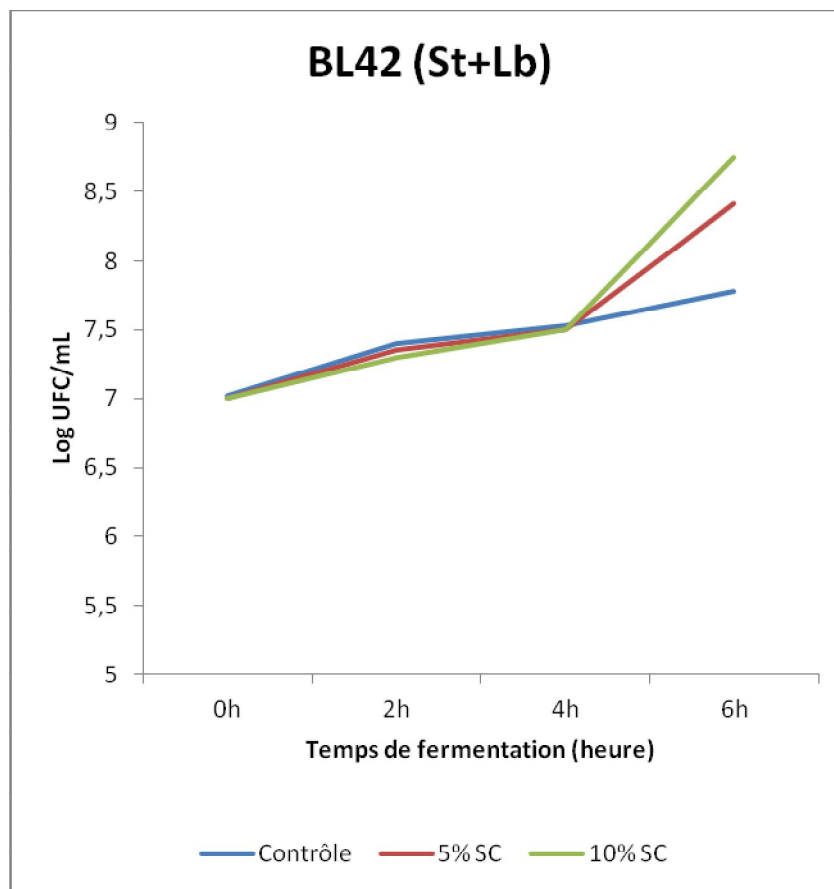


Figure 8 : Cinétique de croissance de la *Bifidobacterium longum* BL42 en coculture avec les starters *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en absence (contrôle) ou en présence de 5 et 10% de sirop de caroube. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

En revanche, il semble que la présence du sirop de caroube ait un effet favorable ($p \leq 0.05$) sur le pouvoir acidifiant de *S. thermophilus* (fig. 9).

Le lait affiche des valeurs de pH de l'ordre de 5.8 et 5.75 au bout de 6 heures de fermentation et ceci en présence de 5% et 10% de sirop de caroube respectivement, soit des vitesses d'acidification égales à 0.09 h^{-1} et 0.1 h^{-1} (tableau 9).

D'après les travaux de [Riazi et Ziar \(2008; 2010 et 2012\)](#), aucune amélioration significative dans la production de l'acide lactique n'a cependant été constatée chez *S. thermophilus* en présence de miel. Selon les mêmes auteurs des vitesses d'acidification de l'ordre de 0.16 h^{-1} et 0.21 h^{-1} ont été enregistrées.

Par ailleurs, les travaux de [Hariri et al \(2009\)](#) ont montré que la croissance de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sur milieu MRS est plus importante avec un μ_{max} de 0.749 h^{-1} par rapport à sa croissance sur milieu à base d'extrait de caroube à raison de 30g/L et 50g/L soit respectivement des μ_{max} de l'ordre de 0.109 h^{-1} et 0.07 h^{-1} .

Cette croissance est, selon les mêmes auteurs, associée à la production d'acide lactique pendant les trente premières heures de fermentation. Pour la souche *Lactococcus*, la croissance bactérienne est pratiquement identique dans les trois milieux et la quantité d'acide lactique produite dans l'extrait de caroube est supérieure à celle produite dans le milieu M17.

Les vitesses spécifiques maximales obtenues par ces auteurs sur les milieux M17, le milieu à 30g/L et celui à 50g/L d'extrait de caroube sont respectivement de l'ordre de 0.205 h^{-1} , 0.055 h^{-1} et 0.058 h^{-1} .

La cinétique d'acidification de la culture associée de bactéries lactiques en absence de sirop de caroube est améliorée par rapport à celle constatée dans le cas des monocultures.

Le pH chute de 6.35 à 0 heure jusqu'à 4.34 au bout de 6 heures (fig.9), soit une vitesse d'acidification égale à 0.335 h^{-1} (tableau 9). Le temps nécessaire à la coagulation était estimé à 3 heures et 15 minutes et correspond à un pH de 4.95, soit une diminution de l'ordre de 1.4 unité ($\Delta \text{pH} / \Delta T$ égal à 0.44 h^{-1}).

Paradoxalement, il a été constaté que cette souche tend à devenir encore moins acidifiante ($p \leq 0.05$) en présence de 5% et 10% de sirop de caroube; ainsi, la vitesse d'acidification passe de 0.335 à 0.319 et 0.30 respectivement (tableau 9).

Aussi, dans les milieux additionnés de sirop de caroube, les temps de coagulation varient entre 3 heures et 20 minutes et 3 heures et 25 minutes; soit une différence maximale de 10 minutes par rapport au temps de coagulation dans le milieu contrôle.

Les mêmes constatations ont été faites par les travaux de [Riazi et Ziar \(2008; 2010 et 2012\)](#) rapportant que la culture associée de ferments lactiques est légèrement moins acidifiante en présence de 5% de miel clair comparativement au milieu témoin.

En revanche, [Varga \(2006\)](#) a observé que le miel d'*acacia* additionné aux concentrations de 1.3% et 5% n'avait aucun effet inhibiteur vis-à-vis de la culture mixte de *Bifidobacterium longum* en ce qui concerne la production d'acide lactique.

III.1.2.2. Cas de *Bifidobacterium longum* BL42.

III.1.2.2.1. Monoculture de BL42.

Les résultats obtenus ont montré qu'en absence de sirop de caroube, la monoculture de la souche bifide BL42 étudiée produit des acides organiques en quantités très faibles au cours de la fermentation et ces quantités ne permettent pas de coaguler le lait.

Le pH du lait est passé de 6.45 à 6.37, soit un abaissement très faible de l'ordre de 0.08 unité (fig.10). Ainsi, la souche bifide BL42 ne semble pas avoir un pouvoir acidifiant intéressant car elle conduit à l'obtention d'un caillé de texture très peu consistante et fragile.

Cependant, ces faibles performances de *Bifidobacterium longum* BL42 semblent pouvoir être améliorées par l'addition de sirop de caroube car, l'activité de synthèse des acides organiques traduite en terme d'abaissement de pH, a été effectivement stimulée ($p \leq 0.05$) par l'ajout de 10% de sirop de caroube sans pour autant obtenir la texture du caillé recherchée (fig.10).

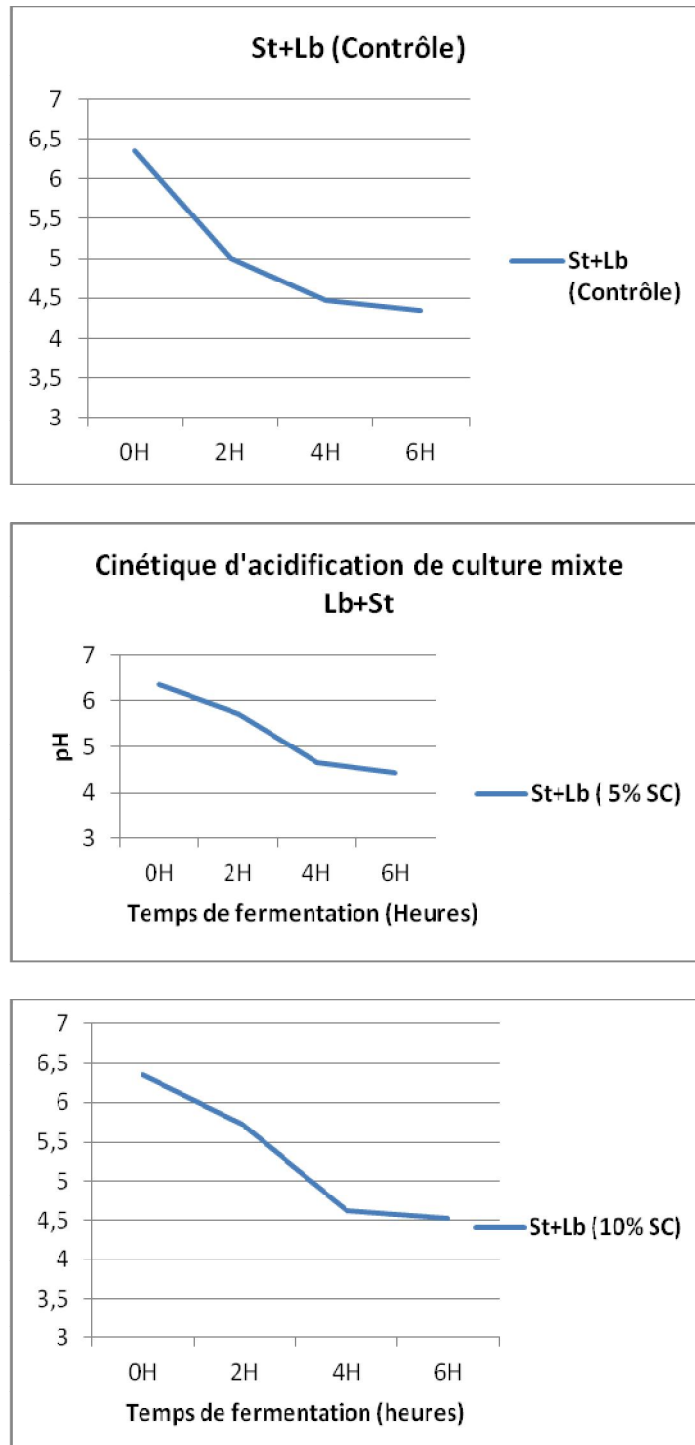


Figure 9 : Cinétique d'acidification du lait par la culture mixte *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à 42°C en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.

Tableau 8: Valeurs moyennes de pH enregistrées au cours de la fermentation du lait à 42°C par la culture mixte *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.

Paramètres		Temps de fermentation			
% sirop caroube	pH	0H	2H	4H	6H
0%	pH moyen	6,35±0,070	5,005±0,049	4,48±0,028	4,34±0,014
	ΔpH/ΔT	0,335			
5%	pH moyen	6,34±1,91	5,7±0,04	4,65±0,005	4,43±0,01
	ΔpH/ΔT	0,319			
10%	pH moyen	6,35±0,07	5,7±0,02	4,62±0,007	4,53±0,014
	ΔpH/ΔT	0,300			

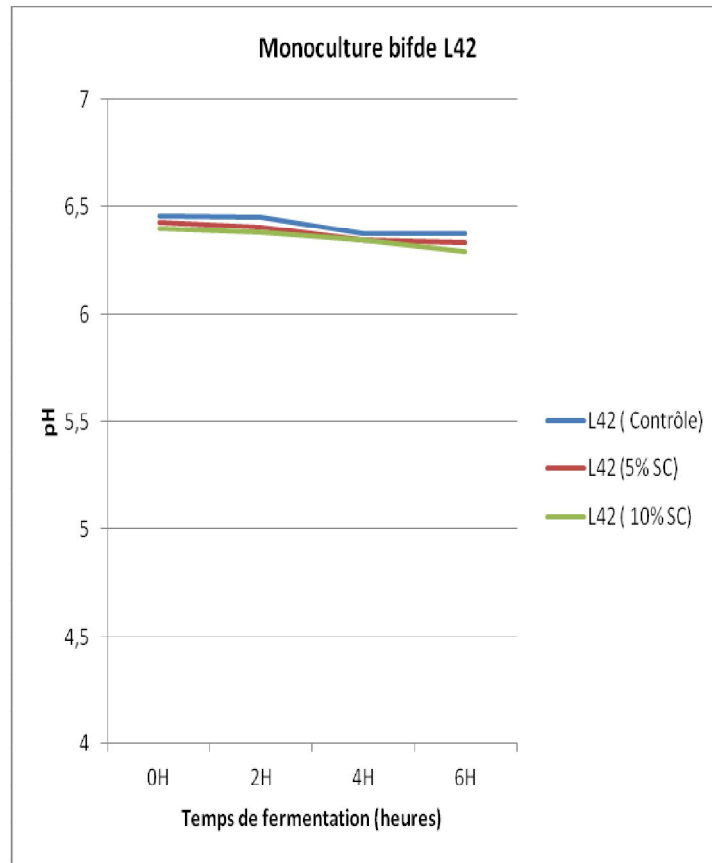


Figure 10 : Cinétique d'acidification du lait fermenté à 37°C par la monoculture de la souche bifide BL42 en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.

Tableau 9: Evolution du pH du lait au cours de la fermentation à 37°C par la monoculture de la souche bifide BL42.

Pramètres		Temps de fermentation			
% sirop caroube	pH	0H	2H	4H	6H
0%	pH moyen	6,45±0,007	6,45±0,00	6,37±0,014	6,37±0,007
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,013			
5%	pH moyen	6,425±0,007	6,4±0,00	6,345±0,014	6,33±0,007
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,015			
10%	pH moyen	6,39±0,007	6,38±0,00	6,34±0,014	6,29±0,007
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,017			

Cette souche, comme la plupart des bifidobactéries, nécessite généralement des temps de fermentations plus longs dépassant les 24 heures sans, toutefois, permettre l'obtention d'un caillé ferme. En effet, le pouvoir acidifiant de la souche bifide BL42 semble plus faible que celui de la souche bifide de référence *Bifidobacterium longum* BLR explorée par [Riazi et Ziar \(2012\)](#).

Plus anciennement, les travaux d'[Ustunol et Gandhi \(2001\)](#) ont montré que le pH du lait additionné de 5% de miel de trèfle diminuait plus rapidement après 12 et 24 heures de fermentation, suggérant une stimulation dans la production des acides organiques chez deux souches de *Bifidobacterium bifidum* sans que cette diminution soit significative.

Par ailleurs, Chick *et al* (2001) ont constaté que l'activité acidifiante de *Bifidobacterium bifidum* fait diminuer le pH jusqu'à 4.55 après 24 heures de fermentation en présence de 5% de miel en comparaison avec les laits additionnés de sucrose, fructose ou les laits témoins.

III.1.2.2.2. BL42 en culture associée avec les starters du yaourt.

La culture associée de la souche bifide BL42 en association avec les bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricu* et *Streptococcus thermophilus*) présente une activité acidifiante intéressante (fig.11).

Le pH diminue à raison de 1.44 unités à la coagulation pour afficher une valeur de 4.91 correspondant à un temps de coagulation d'environ 3 heures et 20 minutes ($\Delta \text{pH} / \Delta T$ égal à 0.45 h^{-1}) (tableau 11).

En effet, ce temps de coagulation étant légèrement ($p \leq 0.05$) supérieur à celui enregistré dans le cas de la coculture des starters entre eux. Les μ_{max} enregistrées dans cette étude se trouvent de loin plus élevées que celles rapportées dans d'autres travaux antérieurs à cette étude.

Riazi *et Ziar* (2008 ; 2010 et 2012) rapportent des vitesses d'acidification ne dépassant généralement pas 0.22 h^{-1} . Globalement, la présence de sirop de caroube à raison de 5% améliore de manière significative ($p \leq 0.05$) la cinétique d'acidification par rapport à la concentration de 10%.

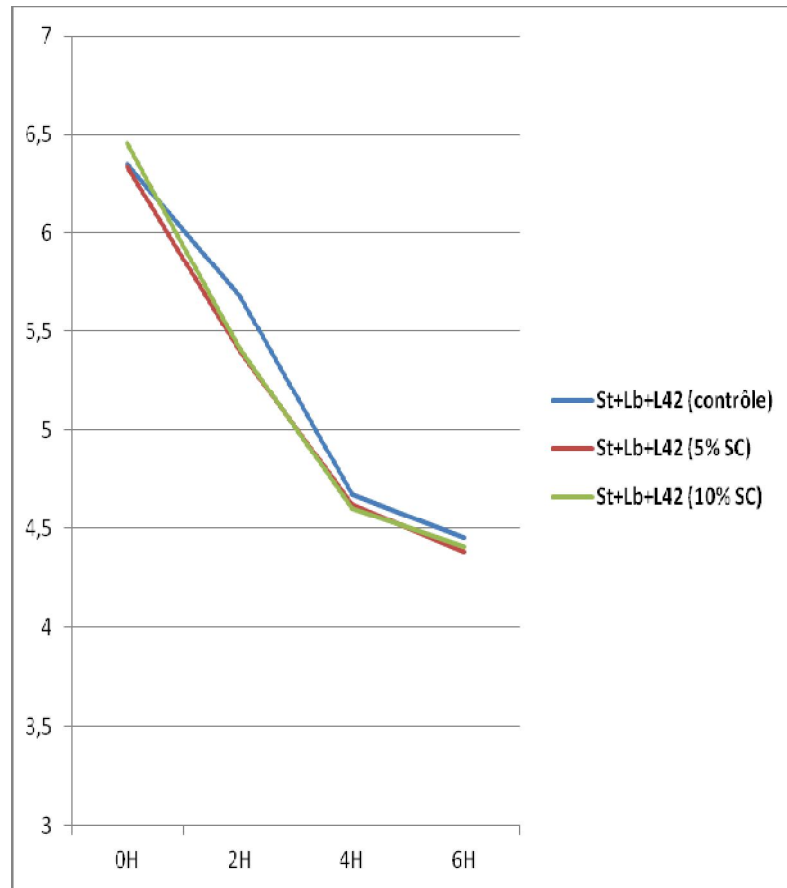


Figure 11 : Cinétique d'acidification du lait par la coculture à 37°C des starters, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, avec la souche bifide BL42 en absence et en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube.

Tableau 10: Evolution du pH du lait fermenté par la coculture des starters, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, et de la souche bifide BL42 en absence et en présence 5% et 10% de sirop de caroube.

Pramètres		Temps de fermentation			
% sirop caroube	pH	0H	2H	4H	6H
0%	pH moyen	6,35±0,00	5,68±0,042	4,67±0,007	4,45±0,035
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,315			
5%	pH moyen	6,33±0,007	5,4±0,056	4,62±0,007	4,38±0,014
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,325			
10%	pH moyen	6,45 ± 0,007	5,41 ± 0,077	4,6 ± 0,077	4,4 ± 0,021
	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$	0,341			

III.2. Effets du sirop de caroube sur la viabilité post-fermentaire des souches au cours de l'entreposage du lait fermenté à 4°C.

III.2.1. Viabilité post-fermentaire de *Streptococcus thermophilus*.

En absence de sirop de caroube, la souche *St. Thermophilus* affiche une très bonne résistance au cours de l'entreposage du lait fermenté à 4°C et semble utiliser son activité protéolytique pour maintenir sa viabilité au dessus de 7,2 log UFC/ml après 28 jours de conservation ; ce qui correspondrait à un taux de viabilité de l'ordre de 80% ; soit une diminution du nombre de cellules viables de l'ordre de 2 unités logarithmiques (fig.12).

Par rapport au témoin (absence de sirop de caroube), le lait fermenté en présence de sirop de caroube semble exercer un effet protecteur notable sur la souche protéolytique *Streptococcus thermophilus*, en minimisant les pertes en biomasse durant la réfrigération.

Après 24 h d'entreposage à 4°C, ces pertes n'étaient que de l'ordre de 1,1 à 1,7% dans les laits fermentés par la culture mixte des starters additionné de 5% de sirop (fig.12)).

Au bout de 4 semaines d'entreposage, les taux de perte de cellules *Streptococcus thermophilus* viables se situaient en dessous de 17%.

Par conséquent, le sirop de caroube testé améliore la viabilité cellulaire avec une biomasse supérieure à 8,2 log UFC/ml après 4 semaines de conservation, dépassant le niveau requis par la législation qui est fixé à 6 log UFC/ml (AFSSA, 2005).

A 10%, le sirop de caroube a présenté un effet protecteur apparent par rapport au témoin sur la souche *Streptococcus thermophilus*. La biomasse maintenue après le 28^{ème} jour d'entreposage est inférieure à celle du départ, traduisant toutefois, un taux de survie assez appréciable de l'ordre de 83%.

D'autres études, utilisant le miel à 10% comme ingrédient stimulateur de la croissance et la survie de souches lactiques, ont montré qu'après 21 jours d'entreposage à 4°C de laits fermentés par l'association des 2 starters du yaourt en présence de miel, la

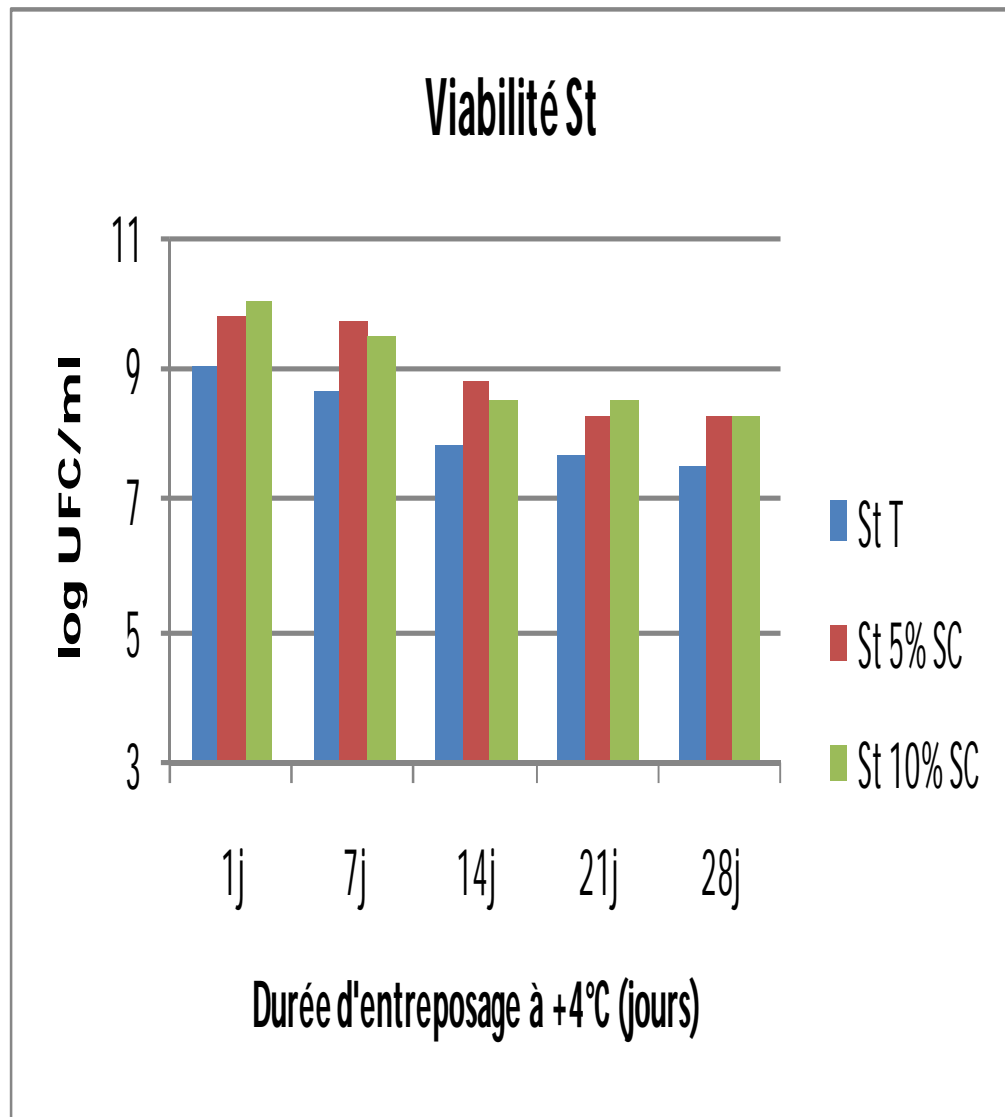


Figure 12 : Viabilité post-fermentaire de *Streptococcus thermophilus* au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture mixte des starters en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube

viabilité de *Streptococcus thermophilus* diminuait de 15% ; mais se trouvait améliorée par rapport au témoin, c'est-à-dire le lait fermenté en absence de miel (Riazi et Ziar, 2008 ; 2012).

Vagra (2006), a observé qu'après 6 semaines d'entreposage à 4°C de laits fermentés par les starters en présence de 1.3 et 5% de miel d'acacia, la viabilité de *Streptococcus thermophilus* était bien conservée car la biomasse vivante s'élevait à 8.8 log UFC/g de yaourt. Il avait constaté une plus grande viabilité pour cette souche que pour *Lactobacillus bulgaricus*.

Riazi et Ziar (2012) ont rapporté des résultats contraires à ceux de Vagra (2006) concernant la viabilité des starters car ils avaient remarqué que *Streptococcus thermophilus* était moins viable que *Lactobacillus bulgaricus* dans des laits fermentés par les deux starters en présence de différents miels.

III.2.2. Viabilité post-fermentaire de *Lactobacillus bulgaricus*.

La souche lactobacille a montré une bonne capacité de survie en absence de sirop de caroube avec une quantité de biomasse de 6,8 log UFC/ml soit une perte de l'ordre de 3 unités log à la fin de la durée d'entreposage au froid, ce qui correspond à un taux de viabilité de l'ordre de 71% (fig. 13).

Un effet positif du sirop de caroube utilisé à 5% a été observé dans les laits fermentés avec *L. bulgaricus*. Au 1^{er} jour d'entreposage, la quantité de biomasse relevée était de 10 log UFC/ml, alors qu'à la fin de cette période cette quantité était égale à 7 log UFC/ml soit un taux viabilité équivalent à 70%.

En outre, la survie de *L. bulgaricus* dans les laits fermentés additionnés de 10% de sirop de caroube est plus importante par rapport au milieu témoin, et ce dès le 1^{er} jour de conservation. A la fin de la période d'entreposage, une perte de l'ordre de 26% a été enregistrée ; soit un taux de survie de l'ordre de 74%.

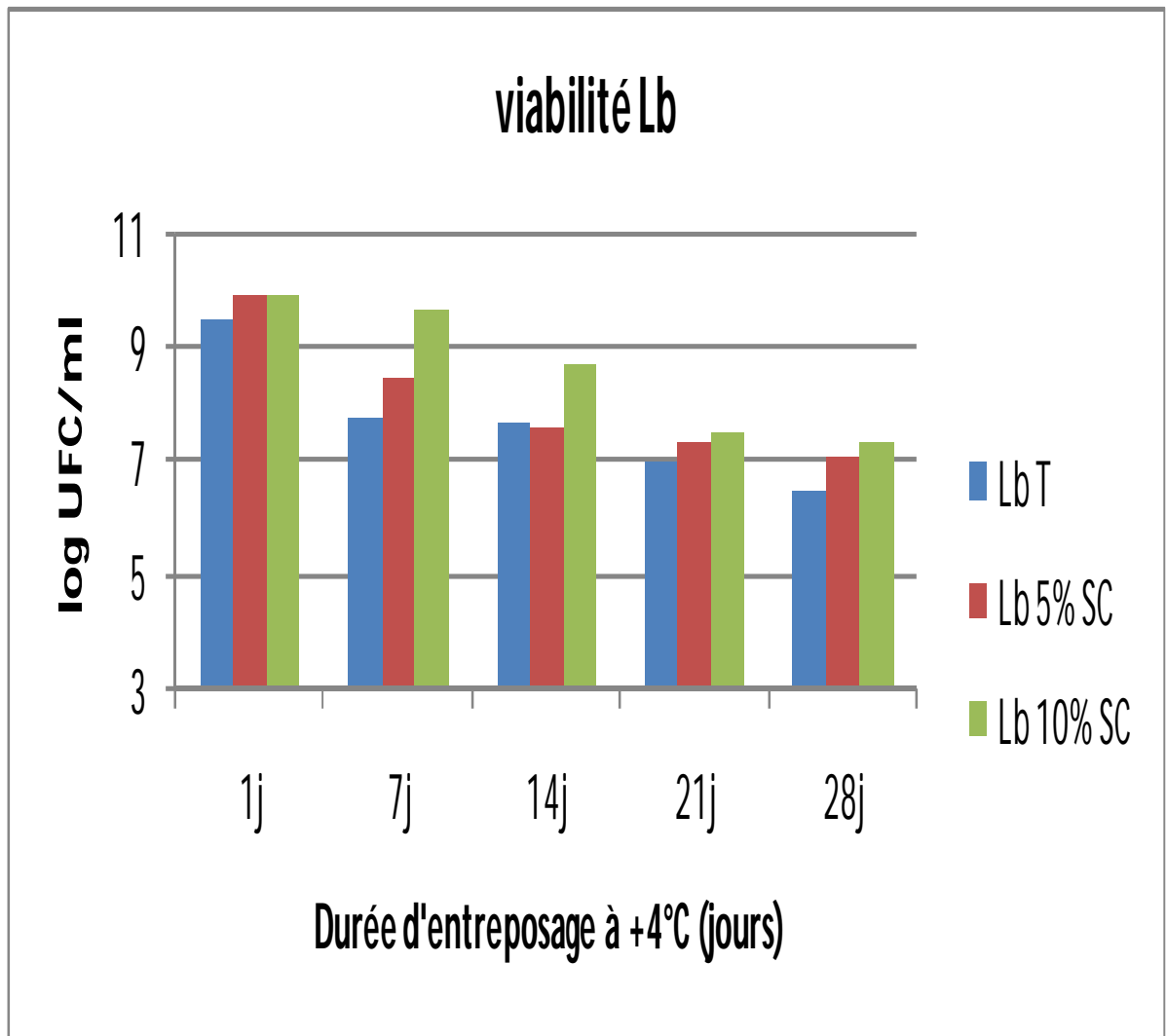


Figure 13 : Viabilité post-fermentaire de *Lactobacillus bulgaricus* au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture mixte des starters en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube

Si l'on compare les résultats de cette expérience avec ceux d'autres auteurs, on pourra constater que [Riazi et Ziar \(2012\)](#) trouvent que la viabilité de *Lactobacillus bulgaricus* est meilleure que celle de *Streptococcus thermophilus* dans des laits fermentés par ces deux starters en présence de miel.

III.2.3. Viabilité post-fermentaire de *Bifidobacterium longum* BL42.

En absence de sirop de caroube, la souche bifide a montré une perte de viabilité remarquable après 28 jours d'entreposage à 4°C. La quantité de biomasse relevée au

dernier jour de conservation était de 5,5 log UFC/ml alors qu'elle était de 8,2 log UFC/ml lors du 1^{er} jour; soit une baisse de viabilité de l'ordre de 33% (fig.14).

Après introduction de 5% de sirop de caroube, nous avons constaté une amélioration de la viabilité de cette même souche avec une biomasse de 8 log UFC/ml pendant la dernière semaine de conservation soit une différence de 32% par rapport au témoin.

Avec les laits fermentés additionnés de 10% de sirop de caroube, les pertes de biomasse étaient remarquables dès le 7eme jour avec une biomasse de l'ordre de 7,5 log UFC/ml. Cette baisse de viabilité a continué jusqu'à la fin de la période d'entreposage en enregistrant une biomasse de 6 log UFC/ml soit une baisse estimée à 37% par rapport au 1^{er} jour de conservation.

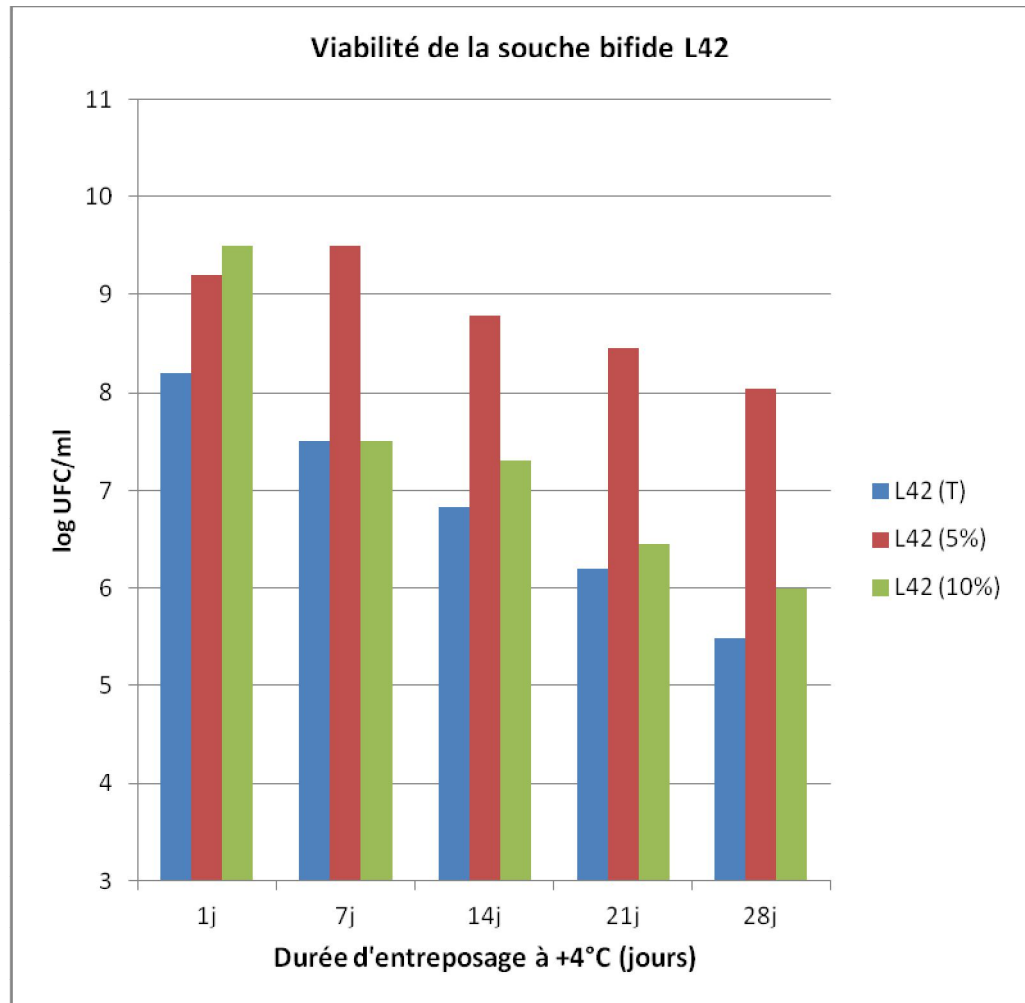


Figure 14 : Viabilité post-fermentaire de *Bifidobacterium longum* BL42 au cours des 28 jours d'entreposage à 4°C du lait fermenté par la culture associée des starters et de BL42 en absence (T) ou en présence de 5 ou 10% de sirop de caroube

Conclusion.

A l'issue de cette expérience, nous avons exploré l'effet du sirop de caroube sur les aptitudes fermentaires et le développement de souches lactiques classiques associées à une souche d'intérêt digestif, *Bifidobacterium longum* BL 42, dans un aliment universellement consommé, le lait écrémé reconstitué.

Les observations qui ont été faites indiquent que la souche BL42 n'est pas adaptée au milieu lait et sa monoculture dans un tel milieu ne peut pas être envisagée. Ceci s'explique par l'origine digestive de cette souche qui est plutôt habituée à un environnement moins acide et strictement anaérobie. Cela ne signifie pas que les souches d'origine digestive ne peuvent pas s'adapter à l'environnement lait car il existe de nombreuses souches d'origine digestive qui ont été domestiquées par l'industrie laitière (exemple des souches utilisées par Danone).

Cependant, les résultats que nous avons obtenus dans ce travail montrent que la souche *Bifidobacterium longum* BL42 arrive à se développer sur milieu lait lorsqu'elle est associée aux starters du yaourt. L'objectif principal d'une telle expérience c'est de pouvoir maintenir la biomasse de cette souche à un taux minimal de 6 logUFC/ml (c'est le taux requis par la législation des probiotiques) dans l'aliment véhicule que l'on prépare et qui est représenté par le lait fermenté ici.

Le sirop de caroube est riche en sucres assimilables sans trop de peine par les cellules et son addition au milieu lait dans la présente expérience a permis de stimuler la croissance et le pouvoir d'acidification des souches cultivées. En culture associée avec les starters, la biomasse bifide BL42 a atteint des niveaux équivalents à 8.3 et de 8.8 log UFC/ml à la coagulation, en présence de 5 et 10% de sirop de caroube, respectivement ; ce qui représente plus de 25% d'amélioration de la quantité de biomasse accumulée.

Ce résultat montre clairement que le sirop de caroube stimule la croissance de *Bifidobacterium longum* BL42.

L'effet du sirop de caroube sur la viabilité des souches en général, et de la souche *Bifidobacterium longum* BL42 en particulier, au cours de la conservation du lait fermenté à 4°C est positif car les pertes en cellules sont significativement diminuées et se limitent à 32 et 37% en présence de 5 et 10% de sirop de caroube dans le lait, respectivement.

Là aussi, le sirop de caroube apparait comme un ingrédient d'intérêt pour l'industrie laitière.

Références bibliographiques

- Aafi A. (1996)**, Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), Centre Nationale de la Recherche Forestière, Rabat (Maroc), pp. 10.
- ABI-AZAR R, 2007**. Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus. AgroParisTech. ThésedeDoctorat.
- Abu-Tarbush HM., Al-Dagal MM., et Royli MA. (1998)**. Growth viability and probiotic activity of bifidobacteria in whole camel milk. J. Dairy Sci.84 : 759-568.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2002**. Recommandation pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'inocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire. Souches nouvelles ou modifiées- application différentes de souches déjà utilisées. Rapport du comité d'expert spécialisé microbiologie de l'AFSSA du 22 Novembre 2002.
- Agerbaek, M., L. U. Gerdes, and B. Richelsen. 1995**. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. European Journal of Clinical Nutrition 49:346-352.
- Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., (2007)**, Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°153, IAV Rabat, pp.1-4.
- Albanell E., Caja G. and Plaixats J. (1991)**, Characterization of Spanish carob pod and nutritive value of carob kibbles, Options Méditerranéennes N°16, pp. 135- 136.

Ali Riazi and Hasnia Ziar (2008). Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *African Journal Of Biotechnology*. 7 (12), pp. 2055-2063.

Ali Riazi and Hasnia Ziar (2012). Effect of honey and starter culture on growth, acidification, sensory properties and bifidobacteria cell counts in fermented skimmed milk. *African journal of microbiology research*. 6 (3), pp. 486-498,

Apperloo-Renkema H.Z., Jagt T.G., Tonk R.H., Van Der Waaij D.(1993). Healthy individuals possess circulating antibodies against their indigenous faecal microflora as well as against allogeous faecal microflora: an immunomorphometrical study. *Epidemiol Infect*;111:273-85.

Arrigoni, E., P. Marteau, F. Briet, P. Pochart, J. C. Rambaud, and B. Messing. 1994 . Tolerance and absorption of lactose from milk and yogurt during short- bowel syndrome in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 60:926-929.

Aso, Y., H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, and S. Naito. 1995 . Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. *European Urology* 27:104-109

Ballongue J., Schumann C., Quignon, 1997. Effects of lactulose and lactatiol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scand J. gastroenterol*. 32 (suppl 222) :41-44.

Battle I. and Tous J. (1997). Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institut e of Plant Genetic and Crops Plant Research. Gatersleben/International Plant Resources Institute. Rome. Italy.

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

Ben Hsouna A., M. Trigui, S. Jaoua, (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.

Bernalier-Donadille, A. 2009 . Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme, In J. C. Rambaud, J. P. Buts, G. Corthier, and B. Flourié (eds.), Flore microbienne intestinale. John Libbey Eurotext, Paris.

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

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.

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.

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

Bornet FRJ, 1994. Undigestible sugars in food products. Am J. Clin. Nutr. 59 (suppl) : 763S-769S.

Brandtzaeg P., Halstensen T.S., Kett K., Krajci P., Kvale D., Rognum T.O., Scott H., (1989). Sollid L.M. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology ;97:1562-84.

Buddington R., Williams C., Chen S. and Whiterly S. (1996) Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. American Journal of Clinical Nutrition 63(5):709-716.

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

Campbell J., Fahey G. and Wolf B. (1997) Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, caecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* 127:130-136.

Carvalho F, Patricia Moniz Luis C. Duarte M. Paula Esteves Francisco M. Grio, (2011). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* (2011) 38:221–227 DOI 10.1007/s10295-010-0823-5.

Challa A., Rao DR., Chawan CB., Shackelford L., 1997. Bifidobacterium longum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18 : 517-521.

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

Cherbut C., Michel C. and Lecannu G. (2003) The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *Journal of Nutrition* 133:21-27.

Chick H., Shin HS., Ustinol Z. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria in skim milk containing honey. *J. Food Sci.* 66 : 478-481.

Choo CC., Hou JW. (2000). Growth of bifidobacteria in soy milk and their survival in the fermented soy milk drink during storage. *Int Food Microbiol.* 56 : 113-121.

Coit J.E., (1967), Carob varieties for the semi-arid southwest, *Fruit Varieties. Hort. Digest* N°21, pp. 5–9.

- Cristenden G., 1999.** Prebiotics. In : Tannock G, Wymondhan. Probiotics. A critical review, Hor. Sci. Press , UK ; 141-156.
- Crittenden R. and Playne M. (1996)** Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science & Technology 7:353-361.
- Cummings J. and MacFarlane G. (2002)** Gastrointestinal effects of prebiotics. British Journal of Nutrition 87(suppl2):145-151.
- Danielsson, H. and B. Gustafsson. 1959 .** On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats. Bile acids and steroids 59. Archives of Biochemistry and Biophysics 83:482-485.
- Dave RI., et Shah NP. (1997).** Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made with commercial starter cultures. Int. Dairy J.7 :537. Milk J. Soc. Dairy Technol. 31 :209-212.
- De Vrese, M., A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Laue, and J. Schrezenmeir. 2001 .** Probiotics - Compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition 73:421S-429S.
- Delzenne N.M., and Roberfroid MB.(1994).** Physiological effects of nondigestible oligosaccharides. Lebensm Wiss Technol ; 27: 1-6.
- Desjardin ML., Roy D., Goulet J., (1991).** B-Galactosidase and proteolytic activities of bifidobacteria in milk : A preliminary study. Milchwissenschaft, 46(1), 11-13.
- Desjardins ML., et Roy D., 1990.** Uncoupling of growth and acid production in bifidobacterium ssp.J.Dairy Sci.73 :1478
- Drasar B.S. and Barrow P.(1985).** Intestinal microecology. Van Nostrand reinhold, Workingham Drasar B.S. Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1974;3:187-96.

Drouault, S., G. Corthier, S. D. Ehrlich, and P. Renault. 1999 . Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl.Environ.Microbiol.* 65:4881-4886.

Dubey UK., Mistry VV., 1996. Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *J. Dairy Sci.* 79 : 1156-1163.

Ducluzeau R. and Raibaud P.(1979). Écologie microbienne du tube digestif : ces microbes qui nous protègent. Ducluzeau R et Raibaud P (Eds). Masson, Paris. ; 95p.

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

Fagarasan S., Honjo T.(2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* ;3:63-72.

FAO/WHO (2001). "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria ."

FAO-STAT (2010), www.fao.org

Finegold S., Suttler V. and Mathison G. (1983). Normal indigenous intestinal microflora. In: Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease.* Academic Press, New-York..

Folch I., Guillen R. (1981), *La vegetacio dela Països Catalans*, Ed. Ketres, Barcelona.

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

Franck A. (2002) Prébiotiques. In : *Aliments Fonctionnels.* Ed Tec & Doc, Londres-Paris-NewYork, 104-123.

Fuller R.(1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* ;66:365-78.

- García-Ochao F. and Casas J. A. (1992).** Viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions. *J. Sci. Food Agri.* 59: 97- 100.
- Gay-Crosier F, Schreiber G, Hauser C (2000)** An aphylaxis from inulin in vegetables and processed food. *N Engl J Med* 34 2 : 1372.
- Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F., (2004),** Floral characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Biol*, pp. 41-51.
- Gharnit N., N. El Mtili, A. Ennabili, F. Sayah, (2006),** importance socio-économique du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dans la Province de Chefchaouen (nord-ouest du Maroc), *Rev. Tela Botanica Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France BDNFF, VOL.4.02 N°33*
- Gibson G.R. and Roberfroid M.B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* ;125:1401-12.
- Gifraffa G., Puris A., Valcuvì L., Gutti M., Neviani D., 2001.** Genotypic and phenotypic heterogeneity in streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products. *J., Appl Microbiol.* 91 : 937-943.
- Gill, H. S. 2003 .** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. *Best.Pract.Res.Clin.Gstroenterol.* 17:755-773.
- Gorbach S.I, Plaut A.G, Nahas L., Weinstein L., Spanknebel G., Levitan R. (1967).** Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology* ;53:856-67.
- Grizard D. and Barthomeuf C. (1999)** Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents : mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction, Nutrition, Development* 39(5-6):563-588.

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

Harms, H. K., R. M. Bertele-Harms, and D. Bruer-Kleis. 1987 . Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *New England Journal of Medicine* 316:1306-1309.

Hickson, M., A. L. D'Souza, N. Muthu, T. R. Rogers, S. Want, C. Rajkumar, and C. J. Bulpitt. 2007 . Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal* 335:80-83.

Holzapel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis In't Veld J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* ;41:85-101.

Isaacs, K. and H. Herfarth. 2008. Role of probiotic therapy in IBD. *Inflammatory bowel diseases* 14:1597-1605.

Isolauri, E., H. Majamaa, T. Arvola , I. Rantala, E. Virtanen, and H. Arvilommi. 1993. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105:1643-1650.

Isolauri, E., T. Arvola, Y. Sutas, E. Moilanen, and S. Salminen. 2000 . Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 30:1604-1610.

Izquierdo Alegre E., 2009. Les proteines bacteriennes en tant que biomarqueurs de l'activite probiotique. Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien Département des Sciences Analytiques. UMR 7178. P 1-230.

Janer C., Pelaez C., Requena T., (2004). Caseinopeptide and whey protein concentrate enhance *bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chem.* 86 : 263-267.

- Jian g T, Suar ez FL, L e vitt MD, Nelson SE, Ziegler EE (2001)** Gas pr oduction by feces of in fants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32 : 534-5 41.
- Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A., and Voragen, A. G. (2002).** In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 50, 6205-6210.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. 2001 .** Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. 2001 .** Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079
- Kaplan H. and Hutkins R. (2003)** Metabo lism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and environmental microbiology* 69(4):2217-2222
- Kien CL, 1996.** Digestion, absorption and fermentation of carbohydrates in the newborn. *Clin perinatol.* 23 : 211-28.
- Kivçak B. and Mert T. (2002).** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. *Turk J.Biol.* N°26, pp.197-200.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965).** "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." *Science* 147: 747-8.
- Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005 .** Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International* 38:135-142
- Lizardo R., J. Cañellas, F. Mas, D. Torrallardona, J. Brufau, (2002),** L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les

performances et la santé des porcelets, Journées de la Recherche Porcine, N°34, pp.97-101.

Loeb H., Vandenplas Y., Wursch P., Guesry P. (1989), Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* N°8, pp. 480-485.

Makris D. P. and Kefalas P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 105- 108.

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

Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. (2001a). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* ;67:4939-42

Marteau, P. and F. Shanahan. 2003 . Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17:725-740.

Marteau, P., P. Seksik, and R. Jian. 2002 . Probiotics and intestinal health effects: A clinical perspective. *British Journal of Nutrition* 88:S51-S57.

Matsunaga T. and Rahman A. (1998). What brought the adaptive immune system to vertebrates?—The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev* ;166:177-86.

Metchnikoff E.(1907). The prolongation of life. Dans: *Optimistic studies.* Butterworth-Heinemann, London. .

Mitrakos K. (1981), Temperature germination responses in three Mediterranean evergreen sclerophylls, in *Components of Productivity of Mediterranean-climate*

Regions-Basic and Applied Aspects (N.S. Margaris and H. A. Mooney, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/London, pp. 277-279.

Mitsuaka T.(1989). Microbes in Intestine. Dans: Ed. Yakult Honsha Co., Tokyo, J.

Molis C., Flourie B., Ouarne F., Gailing M., Larti gue S., Guibert A., Bornet F. and Galmiche J. (1996) Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. American Journal of Clinical Nutrition 64(3):324-328.

Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G (2002) Dosage -related bifidogenic effects of galactose- and fructo-oligosaccharides in formula-fed term infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 34 : 291-295.

Nabli A. (1989), Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne, 1. Éléments de botanique et de phyto-écologie, MAB-FST-Laboratoire de botanique fondamentale et appliquée, pp. 247.

Ndir B., Lognay G., Wathelet B., Cornelius C., Marlier M., Thonart P., (2000), Composition chimique du néné, condiment alimentaire produit par fermentation des graines du caroubier africain *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth, (4, 5) Biotechnol. Agron. Soc. Environ. Vol.4, N° 2, pp.101–105.

Nebra Y., Jofre J., Blanch AR., 2002. The effect of reducing agents on the recovery of injured bifidobacterium cells. J. Microbial Methods 49, 247-254.

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

Nicaise P., Gleizes A., Sandre C., Kergot R., Lebrec H., Forestier F., Labarre C. (1999).The intestinal microflora regulates cytokine production

positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. *Eur Cytokine Netw* ;10:365-72.

Nicaise P., Gleizes A., Forestier F., Queno A.M., Labarre C.(1993). Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1; IL-6; TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw* ;4: 133-138

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

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

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

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* N°54, pp.540-546.

Ozaslan C., Turkçapar AG., Kesenci M., 1997. Effect of lactulose on bacterial translocation. *Eur. J. surgery*, 163 : 463-467.

Parker, R. (1974). "Probiotic: the other half of the antibiotic story." *Anim Nutr Health* 29: 4-8.

Parrado J., J. Bautista, E.J. Romero, A.M. García-Martínez, V. Friaiza and M. Tejada, (2008), Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer *Bioresource Technology* Vol. 99, N°7, pp. 2312-2318.

- Perdigón, G., J. C. Valdez, and M. Rachid. 1998 .** Antitumour activity of yogurt: Study of possible immune mechanisms. *Journal of Dairy Research* 65:129-138.
- Pereira, D. I. A. and G. R. Gibson. 2002 .** Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:259-281.
- Petit M.D. and Pinilla J.M. (1995).** Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 145-152.
- Porter E.M., Bevins C.L., Ghosh D., Ganz T. (2002).**The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* ;59:156-70.
- Powrie F., Leach M.W., Mauze S., Menon S., Caddle L.B., Coffman R.L.(1994).** Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* ;1:553-62
- 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.
- Puhan Z. and Wielinga M. W. (1996).** Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). Report Technical Committee of INEC (unpublished).
- Que zel P. et S. Santa (1963),** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.
- Quezel P. et Santa S. (1962/63).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méditerranéennes. Tome 1. Edit CNRS. Paris
- Rafter, J. 2002 .** Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition* 88:S89-S94.

- Rasic LJ., Kurman JA., 1983.** Bifidobacteria and their role. Birkhauser Basel, Boston, Stuttgart.
- Rebour H. (1968),** fruits Méditerranéen, la maison rustique Paris, 330pp.
- Rejeb M. N. (1995),** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.
- Rejeb M. N. (1995),** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.
- Rejeb MN (1989),** Mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse du Caroubier, Rev Res Amélior Prod Milieu Aride I, pp.47-55.
- Riazi A, Hasnia Z., (2010).** Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. Revue « Nature et Technologie ». n° 02/ Pages 17 à 24.
- Ridlon, J. M., D. J. Kang, and P. B. Hylemon. 2006 .** Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. Journal of Lipid Research 47:241-259.
- Roberfroid M. (2001)** Prebiotics : preferential substrates for specific germs ? American Journal of Clinical Nutrition 73(suppl):406S-409S.
- Roberfroid M.B., Bornet F., Bouley C., Cummings J.H. (1995).** Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. Nutr Rev ;53:127-30.
- Roberfroid MB., 2005.** Introducing inulin-type fructans. B. J. nutr. 93, suppl. 1, S13-S25.

Romano A., Barros S., Martins-Loução M.A. (2002), Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, Vol.68. N°1, pp.35-41, 129p.

Romond M.B., Hamze M., Romond C., Bourlioux P. (1990). Host-Bifidobacterium interactions in the axenic mouse: partial characterization of bifidogenic factors in the intestinal contents. *Can J Microbiol* ;36:286-91.

Rousseau V., Lepargneur J., Roques C., Remaud-Simeon M. and Paul F. (2004) Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Soumis à Anaerobe*.

Roy D. 2005. Les aspects technologiques de l'utilisation des bifidobactéries dans les produits laitiers. *Lait* 85 (2005)39-56.

Roy D., Dussault F., Ward P., 1990. Growth requirement of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft*, 45(8), 500-502.

Rumney C.J .and Rowland I.R. (1992). In vivo and in vitro models of the human colonic flora. *Crit Rev Food Sci Nutr* ;31:299-331.

Rycroft C., Jones M., Gibson G. and Rastall R. (2001) A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 91(5):878-87.

Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Microbiol* 91, 878-887.

Sallof-Coste CJ (1997). Bifidobactéries. *Danone world news* 1. Danone, Le Plessis-Robinson, France, 16.

Salminen, S., C. Bouley, et al. (1998). "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." *Br J Nutr* 80 Suppl 1: S147-71.

Samona A., Robinson RK., Marakis S., (1996). Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.*13 : 275-280.

Sánchez S., L.J. Lozano, C. Godínez, D. Juan, A. Pérez and F.J. Hernández, (2010), Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas *Applied Energy* Vol. 87, N°11, pp. 3417-3424

Savage D.C.(1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* ;31:107- 33.

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

Schroeder C.A. (1959), The floral situation of the Carob in California, *Proc. Am. Soc. hort. Sci.* N°74, pp. 248-251.

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

Shah NP (1997). Bifidobacteria : characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissen*, 52 : 16-21.

Shroff K.E., Meslin . Cebra J.J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* ;63:3904-13.

Simpson PJ, Ross RP (2004). Fitzgerald GF et Stanton C. bifidobacterium psychraerophilum sp nov and aeriscardovia aeriphila gen nov sp nov isolated from a porcine caecum Int Syst Evol. Microbial ; 54. 401-406.

Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, C. M., Bauer, L. L., Murphy, M. R., and Fahey, G. C. (2003). In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. J Anim Sci 81, 2505-2514.

Strobel, S. and A. M. Mowat (1998). "Immune responses to dietary antigens: oral tolerance." Immunol Today 19(4): 173-81.

Szymanski, H., J. Pejcz, M. Jawien, A. Chmielarczyk, M. Strus, and P. B. Heczko. 2006 . Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Alimenta Pharmacology and Therapeutics 23:247-253.

Tannock G.W.(1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. Antonie Van Leeuwenhoek ;76:265-78.

Thomas V., Metha A.R. (1983), Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown in vitro., In Sen S.K., Giles K.L., (Eds.), Proc. Int. Plant Cell Cult. Crop Improvement, Calcutta India. New York and London: Plenum Press, pp. 451-457.

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.

Tous j. and Baltte I. (1990), El algarrobo, Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Tucker S. C. (1992). The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Ceasalpinoideae: Cassieae). Am. J. Bot. 79(3): 367-327.

- Tuohy KM., Rouzaud GCM., Bruck WM., Gibson GR (2005).** Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics- assessment of efficacy. *Cur. Pharm. Design*, 11 : 75-90.
- Ustinol Z., et Gandhi H., 2002.** Growth and viability of commercial bifidobacterium spp in honey-sweetened skim milk. *J. Food Prot.* 64(11) : 1775-1779.
- Van't Veer, P., E. M. Van Leer, A. Rietdijk, F. J. Kok, E. G. Schouten, R. J. J. Hermus, and F. Sturmans. 1991 .** Combination of dietary factors in relation to breast-cancer occurrence. *International Journal of Cancer* 47:649-653
- Vardar Y., Seçurenand Ö. And Ahmed M. (1972).** Preliminary results on the chemical composition of the Turkish carob beans. *Qual. Plant Mater Veg . XXI (4):* 318- 327.
- Varga L, 2006.** Effect of acacia honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. Short communication. *Int J. Food microbial.* 108 :272-275.
- Ventling BL., et Mistry VV (1993).** Growth characteristics of Bofidobacteria in Ultrafiltered Milk.*J. Dairy Sci.*76 : 962-971.
- Vidon, N., B. Huchet, and J. C. Rambaud. 1986 .** Effect of *S. boulardii* on water and sodium secretion induced by cholera toxin. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 10:13-16.
- Vinderola, C.G., Bailo N., Reinhemier JA., 2000.** Survival of probiotic microflora in argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Res. Int.*33 : 97-102.
- Yuan X., Wang J., Yao H (2005).** Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of bifidobacterium bifidum. *Anaerobe.*, 11 : 225-229.
- Zhang, M., X. Hang, X. Fan, D. Li, and H. Yang. 2008 .** Characterization and selection of *Lactobacillus* strains for their effect on bile tolerance, taurocholate

deconjugation and cholesterol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:7-14.

Zocco, M. A., L. Z. Dal Verme, F. Cremonini, A. C. Piscaglia, E. C. Nista, M. Candelli, M. Novi, D. Rigante, I. A. Cazzato, V. Ojetti, A. Armuzzi, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2006 . Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23:1567-1574

Zohary M. (1973). Geobotanical Foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart.

Zouhair O. (1996), Le caroubier: situation actuelle et perspectives d'avenir, Document interne, Eaux et forêts, Maroc, pp 22.