Soumis le 15 *Octobre 2013*
Forme révisée acceptée le : *15 Mai 2015*
Email de l'auteur correspondant :
rachabadrou@yahoo.com

Nature & Technology

Effet de l'extrait de caroube sur la croissance de deux candidats probiotiques : *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus rhamnosus*

[a]R. BENGUIAR, [a]R. BENARABA, [b]A. RIAZI

(a) Département des Sciences de la Nature et de la Vie , Université Ibn Khaldoun, 14000 Tiaret.
(b) Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé. Département de Biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abdelhamid Ibn Badis, 27000 Mostaganem

Résumé

La caroube (*Ceratonia siliqua.L*) est fréquemment utilisée par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, pour sa richesse en oligosaccharides et en fibres alimentaires. Ces substances font de la caroube un candidat potentiel au statut prébiotique. L'objectif de ce travail s'intéresse dans un premier temps à la caractérisation de *L. fermentum et L . rhamnosus* pour leur attribuer le statut de probiotique et dans un deuxième temps, à évaluer l'effet de caroube (*Ceratonia siliqua.L*) sur la croissance de ces deux bactéries. Des essais préliminaires ont révélé que les concentrations optimales d'utilisation de l'extrait de caroube sont de 1 et de 8% (P/V) pour *L. rhamnosus* et *L. fermentum*, respectivement. L'effet de ces deux concentrations optimales d'extrait de caroube a été évalué sur la croissance de ces deux souches candidats au statut probiotique. Les résultats montrent que la croissance de *L. fermentum* appréciée après 24 h d'incubation en présence de 8% d'extrait de caroube est quasi identique au témoin (absorbance à 625 nm : 1,08 *vs* 1,13) ce qui laisse penser que cette souche possède une bonne adaptation au milieu à base de caroube. Par ailleurs, la croissance de *L. rhamnosus* est réduite en présence de 1% (p/v) de cet extrait par rapport au témoin (0,88 vs 1,59). Mais cette réduction reste non significative. Par ce fait, cette étude indique que l'extrait de gousse de caroube a une capacité de ralentir la prolifération de *L. fermentum* et *L. rhamnosus*.

Mots clés **:** *Caroube, Probiotiques/Prébiotiques, Croissance bactérienne, L. fermentum, L. rhamnosus*

Introduction

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff a affirmé que les bactéries de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité, c'est le précurseur de l'utilisation de lactobacilles dans le but de restaurer la microflore intestinale via la consommation de laits fermentés. Ces organismes microscopiques bénéfiques sont appelés aujourd'hui ; les probiotiques. Ces derniers sont des microorganismes vivants qui peuvent être intégrés dans différents types de produits alimentaires et pharmaceutiques. En effet un rapport de la FAO (*Food and Agriculture Organisation*) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2001 décrit que ces micro-organismes, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exerceraient un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. A l'heure actuelle les affirmations sur le bénéfice apporté par les probiotiques sont variées ; ces microorganismes sont capables de contribuer positivement à l'activité de la microflore intestinale et, par conséquent, à la santé du consommateur. En outre ils aident à la digestion des fibres, stimulent le système immunitaire et préviennent et/ou traitent la diarrhée [7][16]**.** En réalité, ces micro-organismes ne doivent pas seulement être vivants au moment de l'ingestion, mais aussi être capables de survivre dans le tractus digestif. La maintenance de cette viabilité au niveau intestinal fait appel à des substances de nature polysaccharidiques qui sont considérées eux même comme additifs alimentaires et qui sont agrées sous le nom de prébiotiques. Parmi les prébiotiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, il y a l'inuline et l'oligo-fructose [9]. Le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen d'importance écologique et industrielle [14] [3]. La gousse de caroube est riche en carbohydrates et

particulièrement en sucres hydrolysables qui représentent 40 à 55 % du poids de la gousse et en protéines. Elle contient également des composées phénoliques, les éléments minéraux et les vitamines [12] [10]. Cette richesse pourrait être exploitée en biotechnologie comme un candidat potentiel au statut prébiotique. . Dans ce contexte cette présente étude s'intéresse dans un premier temps à la caractérisation de *L. fermentum et L . rhamnosus* pour leur attribuer le statut de probiotique et dans un deuxième temps, à évaluer l'effet de caroube (*Ceratonia siliqua.L*) sur la croissance de ces deux bactéries.

2 .Matériel et Méthodes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont : ***Lactobacillus fermentum,*** isolée à partir du lait de chèvre cru au sein du laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université ES senia d'ORAN. ***Lactobacillus rhamnosus,*** isolée à partir d'un mélange de probiotiques commercialisé sous forme lyophilisée et sous le nom de (**Lactibiane**) par le laboratoire **PiLeJe (**France) .Cette souche a été identifiée au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université *Ibn Khaldoun* Tiaret. *Staphylococcus aureus* ATCC43300

2.1. Caractérisation des souches probiotiques (*L. fermentum* et *L. rhamnosus)*

Différentes propriétés sont habituellement étudiées *in vitro* pour déterminer si une souche particulière serait appropriée comme un probiotique [11]**.**Ces propriétés incluent la résistance aux différents antibiotiques, l'activité antimicrobienne des probiotiques vis-à-vis des germes pathogènes ainsi que leurs résistances aux acides lors de leur passage gastro-intestinal.

2.1.1. Effet de pH

Le pH de bouillon MRS contenu dans des tubes à essai a été ajusté à des pH différents (pH= 2, pH= 3 et pH= 6.5). Ces tubes ont été inoculés par une suspension bactérienne standardisée **(*L .fermentum, L. rhamnosus*)** selon l'échelle de Mc Farland 02, puis incubée à 37°C [9] . La croissance a été évaluée par mesure de l'absorption, à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-visible) à une longueur d'onde de 625nm, chaque heure et pendant 4 h.

2.1 .2.Activité antibactérienne de *L. fermentum* et *L. rhamnosus* vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne des deux souches de bactéries lactiques (***L. fermentum, L. rhamnosus)*** a été testée selon la méthode de diffusion (méthode des puits) [5]. La gélose Mueller Hinton a été coulée dans des boites de Pétri et laissée se solidifier. Ces boites ont été inondées par une suspension standardisée **(10^6UFC/ml)** de la souche pathogène ***(****Staphylococcus aureus* ATCC43300**)**. A l'aide d'une cloche stérile, des puits d'environ 1 cm de diamètre ont été réalisés dans chaque boite contenant la gélose préalablement coulée ; ces puits sont remplis par le surnageant d'une suspension bactérienne **(*L. fermentum* ou *L. rhamnosus*)** récupéré après une centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes **(*L. fermentum* ou *L. rhamnosus*)**. Après incubation de 24h à 37C°, l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 se traduit par la formation des zones claires autours des puits. Les diamètres de ces zones ont été mesurés.

2.2. Préparation de l'extrait de caroube

La caroube utilisée dans cette étude a été récoltée au niveau de la région de Nekmeria de Mostaganem, le mois de novembre 2011, dont l'espèce est « *Ceratonia siliqua* ». Afin de préparer l'extrait de caroube, les gousses de caroube ont été lavées et séchées puis broyées à l'aide d'un broyeur après les avoir débarrassées de leurs graines. La poudre de caroube obtenue a été tamisée à travers un tamis (0.45mm de diamètre). L'extrait de la farine de caroube a été obtenu par l'addition de l'eau distillée avec le maintien de l'agitation (pendant 24 heures) en utilisant différentes concentrations de matières premières (1%,2%,4%,8% et 12% P/V), puis filtré à l'aide d'un papier filtre (0.45mm) pour éliminer le précipité en poudre et les matières insolubles, ensuite stérilisé par une filtration membranaire (0.22 μm de diamètre).

2.3. Recherche de la concentration optimale de l'extrait de caroube correspondante à une croissance maximale de *L. fermentum L. rhamnosus*

A fin d'obtenir une concentration optimale de l'extrait de caroube correspondante à une croissance maximale des deux candidats probiotiques **(*L. fermentum ou L. rhamnosus)***, des bouillons **MRS** sans glucose contenant différentes concentrations de l'extrait de caroube **(1%,2%,4%,8%** et **12%) (p /v),** ont été inoculés par une suspension bactérienne **(*L. fermentum ou L. rhamnosus)*** puis incubés à 37°C pendant 24h. L'évaluation de la croissance bactérienne a été faite par la mesure de la densité optique (625 nm). à l'aide d'un spectrophotomètre **(UV-Vis Jenway)** à une longueur d'onde de 625nm,

2.4. Cinétique de croissance des deux souches (*L. fermentum, et L. rhamnosus)*

La cinétique de croissance des deux souches (*L. fermentum, et L. rhamnosus* a été évaluée en présence d'extrait aqueux de caroube, en effet deux milieux de culture MRS ont été utilisés : un milieu ordinaire avec glucose utilisé comme témoin et un milieu modifié sans glucose reconstitué avec la concentration optimale de l'extrait de caroube correspondant à une croissance maximale de *L. fermentum ou L. rhamnosus.*

2.4.1. Sur milieu MRS ordinaire

Une série de tubes contenant du bouillon **MRS** a été inoculés par une suspension bactérienne **(*L .fermentum ou L. rhamnosus*)** standardisée à l'échelle de Mc Farland 2 puis incubés à 37°C. La densité optique (625 nm) a été mesurée chaque 2 heures sur une durée de 24 heures.

2.4.2. Sur milieu MRS additionné par l'extrait de caroube.

En suivant la même procédure décrite précédemment, une série de tubes contenant le bouillon MRS modifié avec la concentration optimale d'extrait de caroube a été inoculé soit par une suspension bactérienne *L .fermentum ou L. rhamnosus, aussi* standardisées à l'échelle de Mc Farland 2. Ces étapes ont été suivies d'une incubation de 37°C. Les densités optiques (625 nm) ont été mesurées chaque 2 heures sur une durée de 24 heures. L'évolution de la croissance bactérienne en fonction du temps a été suivie graphiquement.

3. Résultats et discussion

3.1. Propriétés probiotiques

3.1.1. Effet de pH

La résistance de ***L. fermentum*** à l'acidité a été testée *in vitro*, les résultats sont indiqués dans la figure n°1.
Selon les résultats obtenus en évaluant la croissance de ***L. fermentum,*** après une durée d'incubation de 4h, on a observé une résistance de cette dernière au pH=2 **(DO=0.53)** et au pH= 3 **(DO=0.48)** mais avec une faible croissance en comparaison au témoin **(DO=0.84)**; la croissance de ***L. fermentum*** évolue jusqu'à la troisième heure d'incubation dans les trois milieux de culture (pH=6.5(contrôle), pH=2, pH=3) où les densités optiques sont respectivement : 0.806, 0.541 et 0.5025. Au-delà de troisième heure, on a remarqué une diminution de la résistance de ***L. fermentum*** aux pH = 2 et 3 (on a obtenu respectivement une DO de 0.5305 et 0.4885). En revanche, elle augmente au pH = 6.5, le contrôle (D.O = **0.84**). La résistance de ***L. rhamnosus*** au pH=2 et pH=3 a été clairement démontrée par une augmentation de l'absorbance mais d'une façon réduite par rapport au témoin dont la densité optique a été respectivement (0.6 *vs*1.64 et 0.56 *vs* 1.64). La croissance bactérienne est plus élevée au pH contrôle par rapport au pH=2 et 3voir (figure n°2). Ces résultats confirment ceux obtenues par [2], évoquant la tolérance de *L. fermentum* et *L. rhamnosus* à l'acidité et qui montre que la survie de ***L. rhamnosus*** LAB11 et *L. fermentum* LAB8 au pH=2 ne dépasse pas les deux heures cependant dans nos conditions expérimentales, les deux souches testées sont capable de survivre plus de 3 heures ce qui pourrait être suffisant pour atteindre leurs site d'action dans l'intestin.

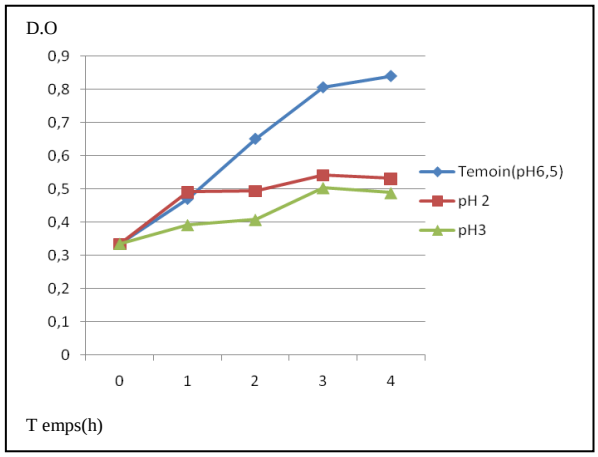

Figure n1 : Effet de pH sur la croissance de *L. fermentum*

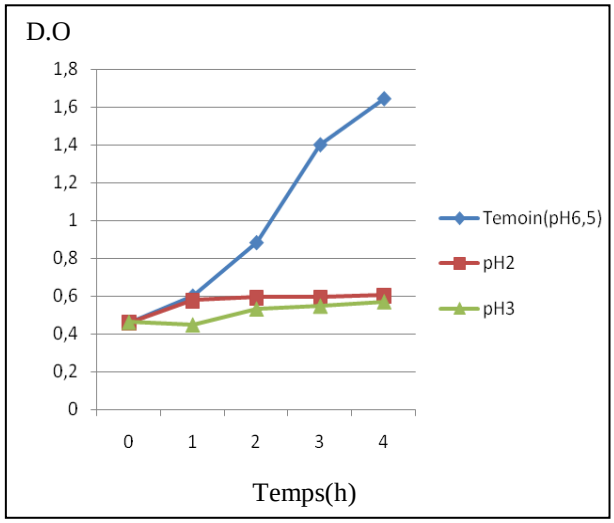

Figure n2 : Effet de pH sur la croissance de *L.rhamnosus*

3.1.2. Activité antibactérienne de *L. fermentum* et *L. rhamnosus* vis-à-vis *Staphylococcus aureus.*

L'effet inhibiteur de *L. fermentum* et *L. rhamnosus* vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC43300 a été expérimenté *in vitro* par la méthode de diffusion. Des études ont montré

que les Lactobacilles possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis une série de bactéries pathogènes, qui peuvent être attribués par l'adhésion concurrentielle à l'épithélium intestinal ou par la production de composés inhibiteurs tels que les acides organiques, peroxyde d'hydrogène, des bactériocines ou reutérine [9]

Nos résultats montrent que les deux souches (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*) présentent une activité antibactérienne contre *Staphylococucs aureus* ATCC **43300** (figure n°3). En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre **12** à **16 mm**. Les résultats obtenus indiquent que *L. rhamnosus* présente un effet inhibiteur vis-à-vis *Staphylococcus aureus* supérieur à celui observé avec *L. fermentum* **(15,7** *vs* **12, 25mm)**.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de [13], indiquant la capacité de certaines souches du genre *Lactobacillus*, comme (*L.plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*) isolés à partir d'un produit laitier , à inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Yesrinia enterocolotica* grâce à la production de bactériocines, des substances antibactériens synthétises par des bactéries lactiques [19], ces derniers attaquent beaucoup plus les bactéries pathogènes Gram positive que les Gram négative et ce en induisant une perforation de la membrane cytoplasmique entrainant ainsi des perturbations dans les fonctions cellulaires [5] ,[4] .Cette différence a été expliquée par [17] ;en indiquant une interaction entre le pédiocine (bactériocine synthétisé par *Pediococcus sacidilactici*) et l'acide lipothécoique présent chez les bactéries Gram positive et absent chez les Gram négative.

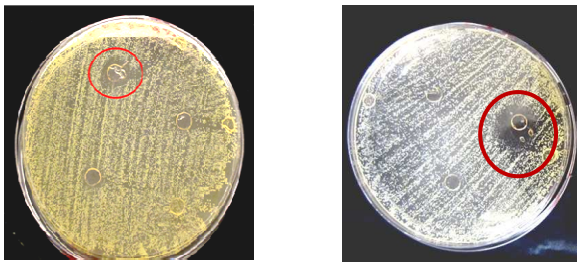

Figure n°3: Zones d'inhibitions induites par *L.fermentum* (A), *L.rhamnosus*(B) vis-a-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 34000.

3.2. Effet de l'extrait de caroube sur la croissance de *L. fermentum*

La recherche de la concentration idéale de l'extrait de caroube qui correspond à une croissance optimale de *L. fermentum* et *L. rhamnosus***,** est représentée dans les figures ci-dessous. L'augmentation de la concentration de l'extrait entraine une augmentation du taux de la croissance de *L. fermentum* jusqu'à atteindre son maximum à une concentration égal à 8% de l'extrait, au-delà de cette concentration on note un abaissement de l'activité bactérienne (figure n° 4).

3.3. Effet de l'extrait de caroube sur la croissance de *L. rhamnosus*

La croissance bactérienne a été maximale à une concentration de 1%, ce qui indique que cette dernière est la concentration optimale pour la croissance de *L. rhamnosus* (figure n°5). A partir de ces résultats obtenus, on a évalué la prolifération des deux candidats probiotiques *L. fermentum* et *L. rhamnosus* en présence des concentrations optimales de l'extrait de caroube (1% pour *L. rhamnosus* et 8% pour *L. fermentum*).

3.4. Evaluation de la cinétique de croissance de *L. fermentum* en présence de 8% d'extrait de caroube

La croissance bactérienne ne peut durer que quelques heures en présence des conditions convenables dans un milieu non renouvelé. Cette croissance se fait grâce à un ensemble de réactions biochimiques assurant la transformation de la matière organiques afin de produire des métabolites et des biomolécules en utilisant des biocatalyseur.

La croissance de *L. fermentum* à une tendance significative dans les deux milieux de cultures (MRS : témoin et le MRS contenant l'extrait de caroube) durant les 24h d'incubation à 37°C (figure n°6), cela indique qu'il y a une consommation de substrats nutritifs présents dans les milieux précédemment cités. En effet, la densité optique mesurée après 24h de fermentation dans le témoin était 1.13 contre 1.0845 pour l'extrait de caroube. Selon [16], les FOS et l'inuline sont capable de stimuler la croissance de certaines souches probiotiques telles que *L.acidophillus* L 10, *L.casei* 26 *et Bifidobacerium animalis lactis* B94.

En outre, la phase stationnaire de la croissance de *L. fermentum* en présence de l'extrait de caroube est débutée qu'après 16h d'incubation**.**

Selon [8]**,** les carbohydrates présentent dans l'extrait de caroube sont utilisés de manière préférentielle soit pour la croissance bactérienne ou la maintenance cellulaire.

3.5. Evaluation de la cinétique de croissance de *L. rhamnosus* en présence de 1% d'extrait de caroube

La croissance de *L. rhamnosus* dans le milieu MRS est maximale après les 6 premières heures de fermentation (DO=**1.81**), au-delà de laquelle on distingue une stabilité de la densité optique désignant une phase stationnaire suivie par une diminution de la croissance bactérienne, ceci peut être expliqué par l'épuisement des nutriments et/ou de l'accumulation des substances toxiques, cette dimminution duré jusqu'à 24h d'incubation où la D.O diminue vers **1**.586 (figure n° 7**)**. Tandis que dans l'extrait de caroube, la croissance est inferieur par rapport au témoin (1.81) dont la densité optique après 6h est 0.583.

Cette croissance a été augmentée après 16h en présence d'extrait de caroube où une phase stationnaire a été marquée par une stabilité de croissance jusqu'à 24 heures d'incubation (D.O = 0.88). Cette différence de croissance

dans les deux milieux indique que *L.rhamnosus* s'adapte plus facilement dans le milieu MRS par apport au milieu contenant l'extrait de caroube, et cela peut s'expliquer par la complexité des sucres contenant dans l'extrait de caroube [1].

4. Conclusion

L'effet stimulateur de l'extrait de caroube est attribué à sa teneur en sucres (glucose, fructose et sucrose) ainsi qu'en fibres alimentaires [1]. Nos résultats révèlent un effet sur la prolifération bactérienne de *L. fermentum* et *L. rhamnosus)* en présence de l'extrait de caroube, cet effet sur *L. fermentum* est quasi identique au témoin ; cependant la croissance de *L. rhamnosus* est légèrement faible en comparaison au milieu riche en glucose ces résultats vont de pair avec ceux de [8] qui démontre que la fermentation des extraits de caroube par certaines bactéries lactiques telle que *L. bulgaricus* est plus faible par rapport à sa croissance dans le milieu MRS.

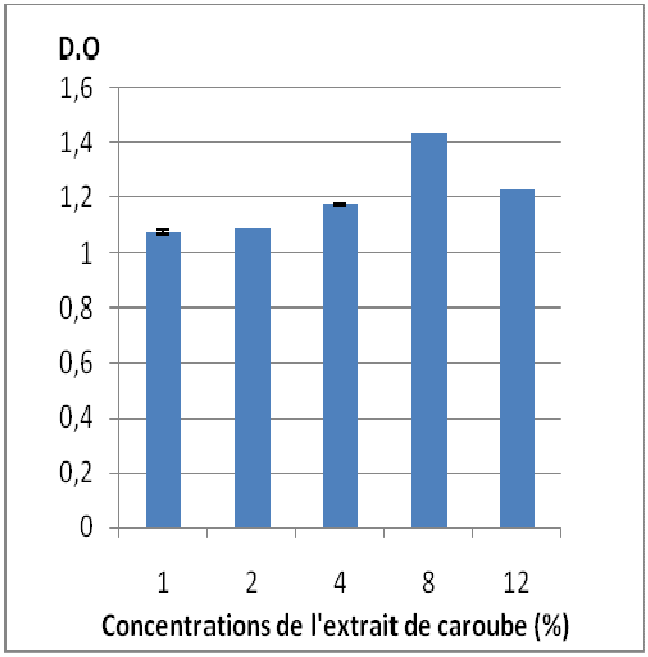

Figure n°04: Effet de différentes concentrations de l'extrait de caroube sur la croissance de *L. fermentum* après 24 h

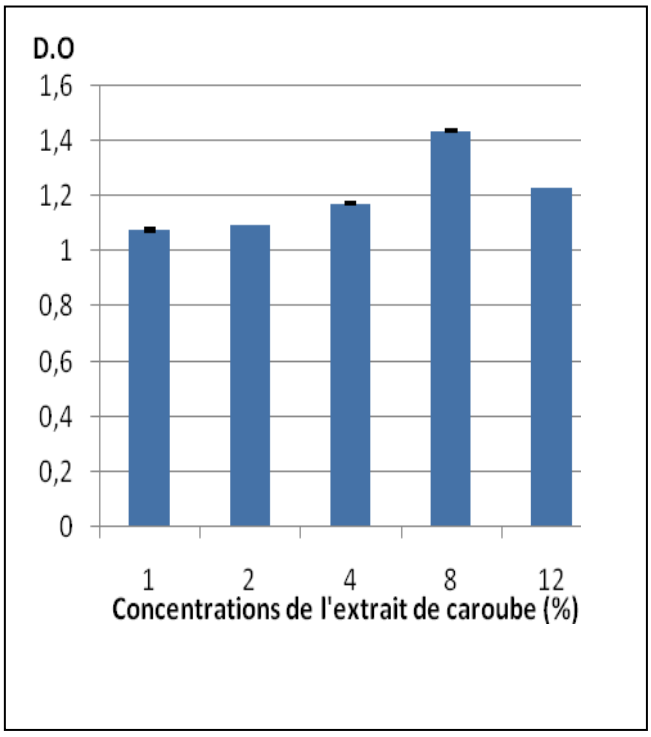

Figure n°05: Effet de différentes concentrations de l'extrait de caroube sur la croissance de *L. rhamnosus* après 24 h

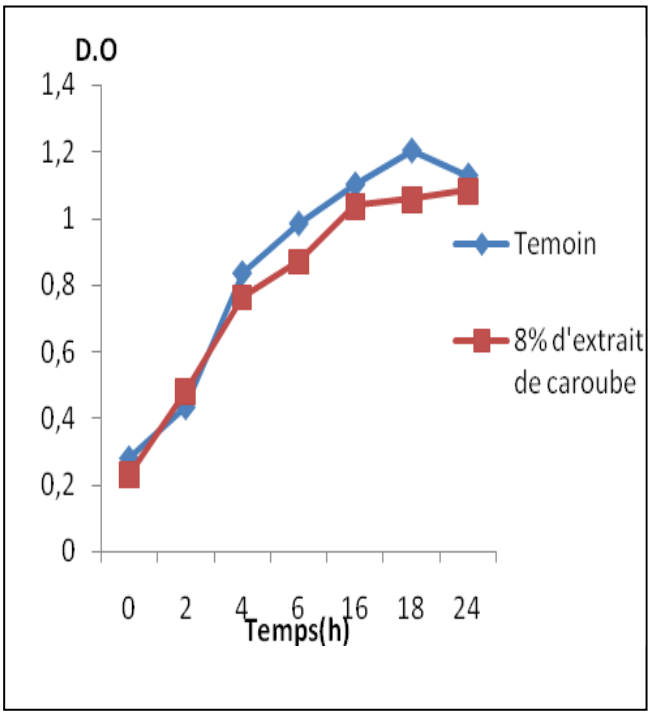

Figure n°06: Cinétique de croissance de *L. fermentum* (en présence de glucose MRS témoin, 8% d'extrait de caroube).

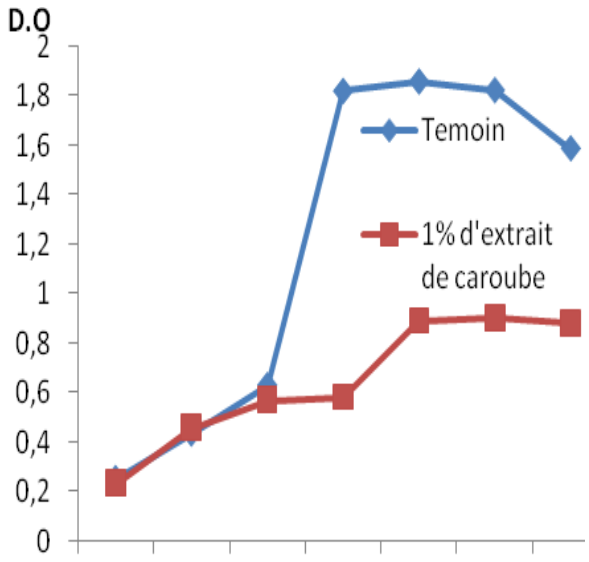

Figure n°07: Cinétique de croissance de *L. rhamnosus* (en présence de glucose MRS témoin, 1% d'extrait de caroube).

4. Références bibliographique

[1] M. Ait Chitt, H. Belmir , A Lazrak. Production de Plants Sélectionnés Greffés de Caroubier. Transfert de Technologie en Agriculture.153(2007) 1- 4.

[2] **S.** Beasley. Isolation, identification and exploitation of lactic acide bacteria from human and animal microbiota. *Yliopistopaino. Helsiinki* (2004) 28.

[3] B. Biner, H. Gubbuk., M. Karhan., M. Aksu, M. Pekmezci. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*) in Turky. Food Chemistry 100(2007)1453-1455.

[4] C . Dortu et P. Thonart **.**Les bacteriocines des bacteries lactiques *:* caracteristiques et interets pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol .Agron .Soc. Environ***,** 13(1) (2009) :143-15*4.*

[5] L. El Moualdi , H. Labioui , L. Bousmaha , A.Benzakour, M.Ouhssine et M. Yachioui. Activité Bactéricide d'une Souche de *Lactococcus lactis* Subsp. *Cremoris*. *Bull.SOC.Pharm.Bordeaux* ,147 (2008). 7-18.

[6] FAO/WHO, Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Power with Live Lactic Acid Bacteria, October (2001).

[7] L. François-Marie, C. Georges. Les bactéries lactiques et probiotiques .*TEC & DOC*.306 (2005) 195-282.

[8] A. Hariri, N. Ouis , F. Sahnouni , B . Djilali**.** Mise en œuvre la fermentation de certains ferments lactiques dans milieu a base des extraits de caroube **.** Rev. Microbiol. Ind .San et Environ . (2009). 37-55.

[9] E. Kirtzalidou, P. Pramateftaki, M. Kotsou et A. Kuriacou. Screening for Lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*. 17(2011):440-443.

[10] D. Makris, P. Kefalas. Carob Pods (*Ceratonia siliqua L.*) as a Source of Polyphenolic Antioxidants. Food Technol. Biotechnol. 42 (2)(2004) 105–108.

[11] A. Ouwehand, S. Salminen et E. Isolori E. Probiotics an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwen hoek*. 82(2002) 279-289.

[12] R. Owen, R. Haubner., W. Hull., G. Erben., B..Spiegelhalder; H. Bartscha. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food and Chemical Toxicology. 41(2003).1727–1738

[13] J.L. Parada, C. Ricoy Caron et P.A. Bianchi. Bactériocine from Lactic Acid Bactéria : Purification, Properties and use as Bioperservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.Vol:59 ; **3** :521-542.

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

[15] M.B. Roberfroid. Health benefits of non digestible oligosaccharides, Advances in Experimental Medecine Biolology, 427(1997) 211-219.

[16] MB. Roberfroid, V .Coxam ,N. Delzenn**e**. Aliments fonctionnels. *TEC & DOC/ Lavoisier* (2e éd.). (2008) 79-129.

[17] A. Savadogo , A.T. Quattara H.N. Bassole I et S. Traore Antimicrobial Activities of Lactic Acid Becteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*; **3(3)** (2004). 174-179.

[18] P. Su, A. Hentikssou, H. Mitchell**.** Selected prebiotics support the growth of probiotics mono-cultures in vitro. Anaerobe. 13(2007) 134-139.

[19] M. Turfail, S. Hussain ,F. Malik et T. Mirza. .Isolation and Evaluation of Antibacterial Activity of Becteriocin produced by *L.bulgaricus* from Yogurt. *African Journal of Microbiolgy Research*. Vol : 5 ; 22(2011) :3842-38.