



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة الشهيد حمّة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar- EL OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de l'effet des extraits d'*Olea europea*
L. et *Punica granatum L.* sur les bactéries probiotiques
isolées à partir du lait camelin**

Présenté Par :

CHERIET Houda

GUIDOUM Hadil

KEHIHA Fattoum

NOURA Nor El -Houda

OBEIDI Abir

Devant le jury composé de :

Présidente: BOUKHARI Dalal

M.A.A

Université d'El Oued

Examinatrice: BOURAS Biya

M.A.A

Université d'El Oued

Promoteur: LAICHE Ammar Touhami

M.C.A

Université d'El Oued

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS



Remerciements

S'il faut beaucoup de motivation, de rigueur et d'enthousiasme pour mener à bien ce mémoire, alors, ce travail de recherche a eu besoin de la contribution de plusieurs personnes, que je tiens à remercier !

*Avant tout, nous remercions le **BON DIEU** Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.*

*Un remerciement spécial notre promoteur, Mr. **LAICHE Ammar Touhami** maître de conférences A, pour tous ses précieux conseils, pour son écoute active, sa disponibilité. En effet, Commencer et finir la totalité du mémoire en si peu de temps, n'a pas été une tâche facile, et nous n'aurons pas tant réussi si nous n'avons pas reçu ses conseils.*

*Nous remercions Mme. **BOUKHARI Dalal** maître assistante A à la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université d'oued, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse, trouve ici l'expression de notre profond respect et toute notre reconnaissance.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme. **BOURAS Biya** maître assistante A à la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université d'oued, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, qui par leurs conseils et leurs efforts durant toutes les années passées, vraiment un grand remerciement pour leur qualité d'enseignement qui nous a été donné.

*Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de l'équipe de laboratoire de biochimie, toxicologie, et microbiologie des Procédés qui ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable, en particulier le responsable du laboratoire **GOBI Sana**.*

NOR EL - HOUDA

FATTOUM

HADIL

HOUDA

ABIR



Dédication

Je dédie ce mémoire

À mon support dans ma vie, qui m'a appris m'a

Supporté et ma dirigé vers la gloire : mon cher

père.

*À ma **maman** qui m'a soutenu et encouragé à aller*

de l'avant et qui m'a donné son amour pour reprendre mes

études.

*À mes chères sœurs : **Khadija et Touha**, que dieu les protèges et*

leurs offre la chance et le bonheur.

*À mon adorable et seul frère : **Miloud** qui me voit l'heureuse dans ses yeux Sans oublier mon Âme sœur **Wahiba**. Qu'elle partage avec moi toutes les belles et*

mauvaises moments de ma vie.

À mes oncles et mes tantes, que dieu leurs donnent une longue et joyeuse vie.

À tous les cousines, les voisins et les amis que j'ai connus jusqu'à maintenant

*À ma belle équipe« **toma. Fati. Toni. Amal. Badiaa. Bouti.***

***Soumi...** » qu'elles me donne toutes l'amours et le courage de termine la vie universitaire.*

*À tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom « **Noura**»*

je dédie ce travail a tous ceux qui ont participé à me réussite.

NOR EL-HOUDA





Dédication

*Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie
ce travail*

À celui qui m'a fait de moi un homme, mon père

À l'être le plus cher de ma vie, ma mère

*À mes chères frères et sœurs khaïra, Moussa, Izdihar et
Massaoud.*

À toutes la famille mes tantes et mes ancles et ses enfants...

À ma copine Banana que dieu te laisse avec moi

*À mes amis de résidence universitaire ma meilleures équipes :
Hodhod, Fati, Toni, Amel, Tima, Bouti, Soumi, Badiaa, Smira,
que dieu vous protège.*

À toutes personnes qui me respectent et qui m'aime



اهداء

اما قبل: الى جدتي " فطيمة بن شعبي" التي سقت قلبي حبا اهدى هذه المذكرة الى روحك الطاهرة .

واما بعد: الى ابي الحبيب " سعد قيدوم" سدي الذي سطوت على ملامحه وقوته الذي تعجب لارتاح و الذي مهد طريق العلم لي، والدي العزيز حفظك الله لنا وجزاك الله عني خير الجزاء.

الى التي وضع الله الجنة تحت اقدامها، امي وصديقتي وروحي "سمراء عبدربه" نور بيتنا وضيائه التي زرعت فيا حب التعلم والاجتهاد و التي كافحت من اجلي اطال الله في عمرك وادامك شمس حياتنا

الى قرة عيني وفؤادي اخوتي عبد الباسط صديق طفولتي وعبد الرحمان بهيتي وفرحي وفقكما الله ويسر دريكمما

الى قطعة القلب اختي سجاد الروح الوفية ومصدر طاقتي و املي

الى جداتي "احمد قيدوم" و"عمار عبدربه" رحمكما الله واسكنكما الفردوس الأعلى

الى خالتي الجميلة كنجوم السماء المتألثة سمية ومريم والى خالي بلال رحمه الله

الى عماتي الغاليات بحة والزهرة وبحرية و خاصة عمتي فطوم حفظها الله و اطال في عمرها والى عمي عبد العزيز بوزيد

الى كل الأساتذة الذين جاهدوا معنا في طريق العلم على راسهم استاذي الغالي و قدوتي الدكتور "عمار العايش التهامي" جزاك الله خيرا في الدنيا والاخرة

الى صديقتي ورفيقاتي الدرب و الحياة الجامعية و اخص بالذكر رمز الوفاء والإخلاص حنان ذات القلب الطيب و فطيمة شريكتي في السكن والضحك والعز و الى صديقتي اللطيفة الزهرة والى فيلسوفتي سارة شنوف و المادنة كوثر .

الى محبي محبي افرح الله قلبك الأبيض و الى الخالة "هدى شريط" حفظك الله وحفظ مائتلك وزوجك عمي "شوقي محبي" الذي كان معنا خطوة بخطوة في انجاز هذه المذكرة.

الى "فريق مغلوبه فانتصر" رفقاء الرباط الساعين لنشر الوعي حول القضايا الإسلامية على راسها القضية الفلسطينية الحالمين بطلاة التحرير في اكناف المسجد الأقصى المبارك.

الى فريق Algerian Positive Vibes الذين يبذلون جهودا من اجل نشر الوعي في هذا المجتمع.

أخيرا الى نفسي المبهمة والمتمسكة بالأمل والى هالاتي السوداء التي رافقتني كل هذه السنوات.

هدايا



اهداء

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات:

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات أهدي تخرجي وثمرة جهدي وخرقة سنام دراستي :

للتبي علمتني اول حروفه ومسك القلم وخط الحروفه على الورق : التي أحرقته جصدا لتنويري ؛للتبي زرعت في بذرة العلم وعلمتني كيفه اسقيها ،للتبي تستقبلني بإبتسامة وتودعني بدعوة " شريط هدي " ...شكرا أمي

إلى سندي الدائم وحسبي المتين ،إلى من كان نور دربي وخنبري وعلمي دون إنتظار ، إلى من جرح الكأس فارغا ليسقيني قطرة و حصد الاشواك من دربي ليمهد لي طريق العلم ،لذي داغ من الأيام سلام للعلی لأرتقي بها في درج الحياة ...شكرا أبي " عميدي شوقي "

إلى سندي في الحياة وضلعي الثابت الذي لا ينعني إخوتي: " خيرالدين " و" ممد القروي "

وأخواتي : " سبأ " ، " رفيفه " ، " رزان " و " هاريا "

إلى الروح التي لم تنسى مع مشاغل الحياة ،إلى من وصتني بما لم تضيفه معايير الحياة ،إلى ابن واطهر خلق الله جدتي " هنية " طيب الله ثراها

إلى الام الثانية ،إلى رمز الطهر والنقاء والفضن الدافئ جدتي " زينب " بارك الله في عمرها

إلى بركة البيت ومنبع العنان جدي " شريط عمار " شفاه الله وحفظه لنا

إلى نبساس العائلة ورمز الحكمة عمي " عميدي جمال " بارك الله في عمره

إلى السند الدائم عمي " جديدي ياسين " حفظه الله

إلى أخوالي الاعزاء " حذيفة " و" مصعب " وإلى عماتي وخالاتي حفظهم الله لي وإلى روح عمتي " سعاد " و" يمينة " رحمهم الله

إلى الصديقات التي ولدتهن لي الحياة " جهينة " ، " لينا " ، " وصال " ، " هديل "

إلى خالتي التي كانت لي الأخت والصديقة والتي تشاركت معي سنين دراستي " أنفال "

وإلى الأهل كافة دون استثناء وكل من ساندني للوصول إلى ما أنا عليه.

واتقدم بجزيل الشكر لأستاذي الفاضل الدكتور " العايش عمار التهامي " على كل ما قدمه لنا من توجيهات

خير



اهداء

أولاً لك الحمد ربي على كثير فضلك وجميل عطائك وجودك، و مهما حمدنا فلا نستوفي حمدك و الصلاة و السلام
على من لا نبي بعده

الى روح امي الثانية ام زوجي "بن عون هنية" الغالية الى التي لم تجف دموعي على فراقها الى التي شجعتني على
اكمال المسيرة و فارقتني في منتصف المشوار

إلى الذي لن تفي كلمات اللغات كلها حقه الى زوجي العزيز "عبيدي شوقي" الذي شجعتني و ساندني على
مواصلة الدرب و دعمني طيلة المشوار كلمات الدنيا عاجزة عن وصف مدى امتناني لك

إلى الينبوع الذي لا يمل العطاء إلى من حاك سعادتي بخيوط منسوجة من قلبها أدام الله وجودك في حياتي يا
أمي الغالية "زواربي احمد زينب"

إلى درعي الذي به اتميت وفي الحياة به اقتديت إلا من احترقت شموعه ليضيء لي درب النجاح ، وكبيرة عمري
و صدر أمانني و كبريائي وكرامتي أبي أطال الله في عمره وشفاه قلبي النابض "شريط عمار"

إلى أبنائي فترة حياتي : خير الدين، عبيد، آية، ممد القروي، رفيف، رزان، ماري. و اسأل الله ان تكون مسيرتي
قدوة يحتذوا بها و يطلوا إلى أسمى وأرقى المراتب

إلى أبناء أبي وأمي إخوتي: حذيفة ومصعب وإخواتي : ماجدة - أمال - كوثر - نبيلة - سهام - خولة - أمينة . انفال

الى عائلة عبيدي الكريمة وعائلة شريط

الى من رافقتني في هذا العمل و خاصة "قيدوم هديل"

الى مؤطر هذا العمل د. العايش عمار تمامي

الى كل من علمني حرفه في مسيرتي

هدايا



Résumé

Notre étude concerne l'effet d'extrait aqueux et hydro-alcoolique des feuilles d'olivier (*Olea europea L*) et l'écorces de grenadier (*Punica granatum*) sur l'activité des bactéries probiotique, en les caractérisant par une étude phytochimique et l'évaluation d'activité bactérienne des extraits de ces deux plantes.

Les quatre extraits préparés à partir des deux plantes ne donnent que le rendement le plus élevé dans l'extrait hydro-éthanolique d'écorce de grenade (42%). Les tests phytochimiques réalisés ont mis en évidence différents métabolites secondaires dans les deux plantes comprenant polyphénols, flavonoïdes, saponosides, terpénoïdes, alcaloïdes, quinones libre sucres réducteurs, et glycosides cardiaque. Des analyses chimiques, des spectrophotométries de polyphénols, de flavonoïdes et de tanins condensés des deux plantes ont été déterminées, ce qui permet de souligner l'activité des probiotiques. Les résultats révèlent des quantités très importantes de composés phénoliques dans les extraits des écorces de grenadier (polyphénols : l'extrait aqueux, 534 mg EAG/ g E, l'extrait hydroéthanolique, 404 mg EAG/ g E ; flavonoïdes : 1628 mg EQ/ g E, 906 mg EQ/ g E respectivement ; tanins : 214 mg EC/ g E, 1222 mg EC/ g E respectivement) contrairement aux feuilles d'olivier (polyphénols : l'extrait aqueux, 292 mg EAG/ g E, l'extrait hydroéthanolique, 194mg EAG/ g E ; flavonoïdes : 190 mg EQ/ g E, 308 mg EQ/ g E respectivement ; tanins : 500 mg EC/ g E, 366 mg EC/ g E respectivement).

Évaluation de l'effet des extraits sur l'activité probiotique nous avons étudié les caractéristiques des probiotiques provenant de l'isolement des bactéries lactiques du lait de chamelle. Les souches ont été caractérisées et identifiées par des méthodes physiologiques et biochimiques afin de prouver que les souches lactiques possèdent une bonne puissance probiotique. Les résultats ont révélé que le streptocoque thermophile constitue la meilleure souche probiotique. On répète les tests biochimiques en présence d'extraits aqueux et alcooliques de *Punica granatum L* et de feuilles d'*Olea europaea* pour étudier comment ces plantes affectent les probiotiques, les résultats ont montré une augmentation de croissance bactérienne et la résistance contre les souches pathogènes et les antibiotique donc Les extrait aqueux et alcooliques de *Punica granatum L* et feuilles d'*Olea europaea L* ont un effet positive sur *Streptococcus thermophilus*. L'extrait hydroéthanolique de l'écorce de grenade montre une activité intéressante sur la bactérie (*Streptocoque thermophile*). Cette propriété biologique est en relation étroite avec la structure et/ou la synergie entre les composés phénoliques.

Mots clés : Bactéries lactiques, Probiotique, *Olea europea L*, *Punica granatum*, Extraits, Composés phénoliques, Activité bactérienne

Abstract

Our study concerns the effect of aqueous and hydro-alcoholic extract of olive leaves (*Olea europea* L) and pomegranate bark (*Punica granatum*) on the activity of probiotic bacteria, characterizing them by a phytochemical study and the evaluation of bacterial activity of the extracts of these two plants.

The four extracts prepared from both plants yielded only the highest yield in the pomegranate peel hydroethanol extract (42%). The phytochemical tests performed showed different secondary metabolites in the two plants including polyphenols, flavonoids, saponosides, terpenoids, alkaloids, reductive free sugars quinones, and cardiac glycosides. The chemical analyses, the spectrophotometry of polyphenols, flavonoids and condensed tannins of the two plants have been determined, which makes it possible to highlight the activity of probiotics. The results reveal very large quantities of phenolic compounds in the extracts of pomegranate tree bark (polyphenols: the aqueous extract, 534 mg EAG/g E, the hydroethanolic extract, 404 mg EAG/g E; flavonoids: 1628 mg EQ/ g E, 906 mg EQ/ g E respectively; tannins: 214 mg EC/ g E, 1222 mg EC/ g E respectively) unlike olive leaves (polyphenols: aqueous extract, 292 mg EAG/ g E, 1 hydroethanolic extract, 194 mg EAG/ g E; flavonoids: 190 mg EQ/ g E, 308 mg EQ/ g E respectively; tannins: 500 mg EC/ g E, 366 mg EC/ g E respectively).

Evaluation of the effect of extracts on probiotic activity we studied the probiotic characteristics of the isolation of lactic acid bacteria from camel's milk. The strains have been characterized and identified by physiological and biochemical methods to prove that the lactic strains have good probiotic capacity. The results showed that *Streptococcus thermophile* is the best probiotic strain. Biochemical tests were repeated in the presence of aqueous and alcoholic extracts of *Punica granatum* L and *Olea europaea* leaves to study how these plants affect probiotics, the results showed an increase in bacterial growth and resistance against pathogenic strains and antibiotics therefore Aqueous and alcoholic extracts of *Punica granatum* L and *Olea europaea* L leaves have a positive effect on *Streptococcus thermophilus*. Hydroethanol extract from pomegranate skin shows interesting activity in bacteria (*Streptococcus thermophilus*). This biological property is closely associated with the structure and/or synergy of phenolic compounds.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotics, *Olea europea* L, *Punica granatum*, Extracts, Phenolic compounds, Bacterial activity.

الملخص

تتعلق دراستنا بتأثير المستخلص المائي والكحولي المائي لأوراق الزيتون (*Olea europea L*) ولحاء الرمان (*Punica granatum*) على نشاط بكتيريا البروبيوتيك، مما يميزها بدراسة كيميائية نباتية وتقييم النشاط البكتيري لمستخلصات هذين النباتين.

المستخلصات الأربعة التي تم إعدادها من المصنعين تعطي فقط أعلى عائد في مستخلص لحاء الرمان هيدرو إيثانول (42%). أظهرت الاختبارات الكيميائية النباتية التي تم إجراؤها وجود مستقلبات ثانوية مختلفة في النباتين بما في ذلك البوليفينول والفلافونويد والصابونوسيدات والتربينويد والقلويدات والسكريات الحرة المختزلة والكينونات والجليكوزيدات القلبية. تم تحديد التحليلات الكيميائية والمقاييس الطيفية للبوليفينول والفلافونويد والعفص المكثف للنباتين، مما يؤكد نشاط البروبيوتيك. تكشف النتائج عن كميات كبيرة جداً من المركبات الفينولية في مستخلصات لحاء الرمان (البوليفينول: مستخلص مائي، 534 ملغ EAG/g E، مستخلص هيدروإيثانوليك، 404 ملغ EAG/g E؛ الفلافونويد: 1628 ملغ E EQ/g E، 906 ملغ E EQ/g E على التوالي؛ العفص: 214 مجم E EC/g E، 1222 مجم E EC/g E على التوالي) على عكس أوراق الزيتون (البوليفينول: مستخلص مائي، 292 مجم E EAG/g E، مستخلص هيدروإيثانوليك، 194 مجم E EAG/g E؛ الفلافونويد: 190 ملغ E EQ/g E، 308 ملغ E EQ/g E على التوالي؛ العفص: 500 ملغ E EC/g E، 366 ملغ E EC/g E على التوالي).

تقييم تأثير المستخلصات على نشاط البروبيوتيك قمنا بدراسة خصائص البروبيوتيك من عزل بكتيريا اللاكتيك من حليب الإبل. تم تمييز السلالات وتحديدتها بالطرق الفسيولوجية والكيميائية الحيوية من أجل إثبات أن السلالات اللبنية تمتلك قوة بروبيوتيك جيدة. كشفت النتائج أن المكورات العقدية المحبة للحرارة هي أفضل سلالة بروبيوتيك. تتكرر الاختبارات الكيميائية الحيوية في وجود مستخلصات مائية وكحولية من *Punica granatum L* وأوراق *Olea europaea* لدراسة كيفية تأثير هذه النباتات على البروبيوتيك، أظهرت النتائج زيادة في نمو البكتيريا ومقاومتها ضد السلالات المسببة للأمراض والمضادات الحيوية، وبالتالي فإن المستخلصات المائية والكحولية من *Punica granatum L* وأوراق *Olea europaea L* لها تأثير إيجابي على المكورات العقدية الحرارية. يُظهر المستخلص الهيدروإيثانوليك لحاء الرمان نشاطاً مثيراً للاهتمام على البكتيريا (المكورات العقدية المحبة للحرارة). ترتبط هذه الخاصية البيولوجية ارتباطاً وثيقاً بالهيكل و/أو التآزر بين المركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض اللاكتيك ، البروبيوتيك ، *Olea europea L* ، *Punica granatum* ، المستخلصات المائية والإيثانولية، المركبات الفينولية ، النشاط البكتيري

Listes des figures

Figure 01 : Bactéries lactiques sous microscope électronique.....	5
Figure 02 : Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	10
Figure 03: les caractéristiques des souches probiotiques.....	14
Figure 04: Représentation schématique de la terminologie relative aux probiotiques.....	15
Figure 05: Mécanismes d'action majeurs des probiotiques.....	19
Figure 06 : Les composés botaniques d' <i>Olea europaea</i> L.....	23
Figure 07 : Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum</i> L).....	26
Figure 08 : <i>Olea europaea</i> et <i>Punica granatum</i>	28
Figure 09: Procédés d'extraction assistée par macération.....	32
Figure 10: Protocole d'isolement des souches lactiques.....	37
Figure 11 : Méthode utilisée pour la recherche de substances antimicrobienne.....	41
Figure 12: variations des rendements.....	45
Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	48
Figure 14: teneurs en polyphénols totaux dans les feuilles d' <i>Olea europaea</i>	49
Figure15: teneurs en polyphénols totaux dans l'écorce de <i>Punica Granatum</i>	50
Figure16: Courbe d'étalonnage de la quercetin pour le dosage des flavonoïdes.....	51
Figure17: Teneurs en flavonoïdes totaux dans feuilles d' <i>Olea europea</i>	51
Figure 18: Teneurs en flavonoïdes totaux dans l'écorce de <i>Punica Granatum</i>	52
Figure 19: Courbe d'étalonnage de la catechin pour le dosage des tanins.....	53
Figure 20: Teneurs en tanins condensé dans feuilles d' <i>Olea europea</i>	54
Figure 21: Teneurs en tanins condensé dans l'écorce de <i>Punica Granatum</i>	55
Figure 22: les résultats de galeries API 10s.....	58
Figure 23: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait aqueux de PG.....	63
Figure 24: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait hydro alcoolique de PG.....	64

Figure 25: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait aqueux d'OE.....	64
Figure 26: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait hydro alcoolique d'OE.....	65
Figure 27: histogrammes d'effet des extraits végétaux sur les antibiotiques.....	69

Liste des tableaux

Tableau 01 : Milieux d'isolement des bactéries lactiques.....	5
Tableau 02: Classification des grands groupes de bactéries lactiques.....	8
Tableau 03: Principaux probiotiques utilisés chez l'humain.....	17
Tableau 04: Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	20
Tableau 05 : Classification de l'espèce d' <i>Olea europaea</i> L.....	21
Tableau 06 : classification botanique de <i>Punica granatum</i> L.....	25
Tableau 07: Souches cibles utilisées et leur origine.....	29
Tableau 08 : liste des produits chimiques et biochimiques.....	29
Tableau 09: Liste des antibiotiques utilisés pour évaluer la sensibilité des souches probiotiques.....	42
Tableau 10: Caractéristiques de chaque extrait préparé de feuille d' <i>Olea europaea</i> et pelures de <i>Punica Granatum</i>	44
Tableau 11: Rendement des extractions aqueuses et hydroéthanolique des feuilles d' <i>Olea europaea</i> et Pelures de <i>Punica granatum</i>	45
Tableau 12: Résultats des tests phytochimiques des extraits préparés.....	46
Tableau 13: Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées.....	56
Tableau 14: Résultats des tests pré-identification.....	57
Tableau 15: Effet du pH acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml).....	58
Tableau 16: Effet du sel biliaire acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml).....	59
Tableau 17: pouvoir antibactérienne des souches lactique.....	60
Tableau 18: Résultats de test d'antibiotique. (I: intermédiaire, S: sensible, R: résistante).....	61
Tableau 19: Effet du sel biliaire acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence de 4 extraits.....	62
Tableau 20: Le diamètre de la Zone d'inhibition des souches testées(en mm).....	66

Listes des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

°C: Degré Celsius

% : Pourcentage

AG : Acide gallique

API : Appareils et Procédés d'Identification

BL : Bactérie Lactique

EA : Extrait aqueux

EC : Extrait catéchine

EQ : Extrait Quercetin

EtOH : éthanol

g, mg, µg : gramme, milligramme, microgramme

Lb : Lactobacillus

Lc : Lactococcus

Ln : Leuconostoc

Mg : milligramme

Min : minute

ml : millilitre

nm: nanomètre

OE : *Olea europaea*

PBS: phosphate-buffered saline

Pc: Pediococcus

PG : *Punica granatum*

PH : potentiel hydrogène

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Première partie : synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques.....	4
I.1. Définition et caractéristiques.....	4
I.2. Habitat.....	5
I.3. Taxonomie et Classification.....	7
I.4. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	9
I.4.1. Voie homofermentaires ou EMP.....	9
I.4.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	9
I.4.3. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- cétolase).....	10
I.5. Intérêt des bactéries lactiques.....	11
I.5.1. Dans l'industrie alimentaire.....	11
I.5.2. Dans le domaine thérapeutique.....	12
II. Probiotiques.....	12
II.1. Historique et définition.....	12
II.2. Notion complémentaire.....	14
a. Prébiotique.....	14
b. Postbiotique.....	15
c. Parabiotique.....	15
d. Symbiotiques.....	15
II.3. Principaux souches bactérienne.....	16
II.4. Mécanisme action de probiotique.....	17
a. Inhibition de l'adhésion des pathogènes.....	17
b. Production de substances antimicrobiennes.....	18
c. Effets immuno-modulateurs.....	18
II.5. Effets bénéfiques sur la santé humaine.....	19

III. <i>Olea europaea</i> L et <i>Punica Granatum</i>	21
III.1. L'olivier (<i>Olea europaea</i> L).....	21
III.1.1. Définition.....	21
III.1.2. Classification botanique.....	21
III.1.3. Caractères botaniques.....	22
III.1.4. Les Composition phytochimique.....	23
III.1.6. Domaines utilisations.....	23
III.2. Le grenadier (<i>Punica Granatum</i>).....	24
III.2.1. Classification botanique.....	25
III.2.2. Description botanique.....	25
III.2.3. Composition phytochimique du <i>Punica Granatum</i> L.....	26
III.2.4. Utilisations des <i>Punica Granatum</i> L.....	27

Deuxième partie : Partie Expérimentale

Chapitre I : Matérielle et Méthodes

1. Matériel.....	28
1.1. Matériel végétal.....	28
1.2. Matériel biologique.....	29
1.3. Milieu de culture.....	29
1.4. Réactifs chimiques.....	29
1.5. Équipements.....	30
1. Méthode.....	31
2.1. Séchage et broyage.....	33
2.2. Extraction des composants phénolique.....	31
2.3. Rendement.....	32
2.4. Caractérisation phytochimique.....	32
2.4.1. Tests phytochimiques.....	33
a. Les tanins.....	33
b. Les alcaloïdes.....	33
c. Les flavonoïdes.....	33
d. Les saponines.....	34
e. Les terpénoïdes.....	34
f. Quinones libre.....	34

g.	Anthraquinones.....	34
h.	Sucres réducteurs.....	34
i.	Glycosides cardiaques.....	34
2.4.2.	Dosage des composés phénoliques.....	34
	a. Dosage des phénols totaux.....	34
	b. Dosage des flavonoïdes.....	35
	c. Dosage des tanins.....	35
2.5.	Isolement et identification des bactéries lactiques.....	36
2.5.1.	Isolement de la flore lactique.....	36
2.5.2.	Conservation des souches.....	37
2.5.3.	Pré-Identification des souches bactériennes.....	37
	a. Examen macroscopique.....	37
	b. Examen microscopique.....	38
	c. Testes physiologique et biochimique.....	38
2.5.4.	Sélection des souches probiotiques.....	39
	a. Tolérance à l'acidité.....	39
	b. Tolérance à la bile.....	40
	c. Pouvoir antimicrobienne.....	40
	d. Sensibilité aux antibiotiques.....	42
2.6.	Etude de l'effet de l'extrait sur les probiotique.....	42
2.6.1.	Pré-culture.....	43
2.6.2.	Testes biochimiques en présence l'extrait végétal.....	43
	a. Teste antibiotiques.....	43
	b. Teste antimicrobien.....	43

Chapitre II : Résultats et Discussions

1.	Résultats et discussions d'extraction.....	44
1.1.	Description des extraits bruts.....	44
1.2.	Rendement d'extraction.....	45
2.	Teste phytochimiques.....	46
3.	Dosages des composés phénoliques.....	48
3.1.	Teneur en polyphénols totaux.....	48
3.2.	Teneur en flavonoïdes.....	51
3.3.	Teneur en tanins condensé.....	53
4.	Résultats et discussion d'isolement et identification des souches bactériennes.....	56
4.1.	Aspecte macroscopique.....	56
4.2.	Aspecte microscopique.....	56
4.3.	Tests biochimiques.....	57
4.4.	Sélection des bactéries probiotiques.....	58
5.	Etude l'effet des extraits végétaux sur <i>streptococcus thermophilus</i>	62
5.1.	Résistance à la bile.....	62
5.2.	Tolérance au ph.....	63
5.3.	Tests d'antimicrobienne.....	65
5.4.	Tests antibiotiques.....	68

Conclusion et perspective
Références bibliographique
Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Le tube digestif s'étend de l'œsophage jusqu'à l'anus. Il permet l'acheminement et la digestion des aliments tout en protégeant l'organisme contre les agents indésirables présents dans la lumière intestinale. L'épithélium gastro-intestinal est recouvert d'une couche de mucus qui contribue à la protection contre les agressions de nature chimique, mécanique ou microbienne, tout en fournissant un habitat pour les bactéries commensales **(DA SIIVA, 2013)**.

Ces bactéries hébergées dans tous les compartiments de tube digestif, et ceux-ci représentent au total dix à cent fois plus de cellules que n'en contient le corps humain. Ces microorganismes appelée le microbiote digestif **(PIQUEPAILLE, 2013)**. Elles établissent une relation mutualiste avec son hôte et participe à la nutrition et au métabolisme **(DA SIIVA, 2013)**, elles sont très importantes, car elle contribue au bon fonctionnement du système digestif et du système immunitaire (défenses naturelles, globules blancs, anticorps...), c'est-à-dire joue un rôle fondamental dans l'homéostasie de l'organisme **(HAROUNE & OUATMANI, 2016., NOEMIE, 2016)**.

Cependant, l'équilibre du microbiote est fragile et sa rupture peut conduire à des situations pathologiques au niveau intestinal. **(ALIOUCHE & CHEKIRED, 2019)**. Ces déséquilibres de la flore microbienne ont des effets néfastes qui peuvent affecter notre capacité à nous défendre contre les mauvaises bactéries **(HAROUNE & OUATMANI, 2016)**, d'où l'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler de façon positive le microbiote dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques, c'est le concept probiotique **(ALIOUCHE & CHEKIRED, 2019)**.

Les probiotiques selon les élaborées par la FAO et l'OMS est caractérisé par : un effet bénéfique, l'absence de pathogénicité et de toxicité, la capacité à survivre dans le tractus gastro-intestinal, résistance à pH bas, sels biliaires et enzymes et la capacité de persister dans l'organisme hôte, l'adhérence à l'épithélium intestinal pour résister au péristaltisme et la capacité d'interagir avec les cellules immunitaires de l'intestin **(MURESAN & al., 2017)**. Ces probiotiques ont des effets multiples en présence des substances appelées les prébiotiques **(HAROUNE & OUATMANI, 2016)**. Plusieurs genres et espèces bactériennes sont considérés comme probiotiques, mais les bactéries lactiques comme les *Lactobacillus*, les *Bifidobacterium*, et *Streptococcus* représentent les groupes bactériens les plus associés au terme probiotique **(BOUGUERRA, 2021., AMROUCHE, 2005)**.

L'origine de ces bactéries dépend de l'application de probiotiques. La source peut être d'origine humaine comme le gros intestin humain, l'intestin grêle ou le lait maternel, origine animale, source alimentaire comme un lait cru ou un aliment fermenté (**SHEWALE & al., 2014**).

Les probiotiques existent dans des conditions drastiques dans le tractus gastro-intestinal donc ils doivent survivre à ces conditions et inhiber l'action des microorganismes pathogènes (**BOUMELTA & BENFRIDJA, 2021**).

En générale, les aliments végétaux représentent une source importante doués de multiples vertus thérapeutiques, du fait qu'ils contiennent de nombreuses substances antioxydants qui jouent un rôle majeur dans la prévention des maladies. Néanmoins, l'idée de l'incorporation des probiotiques avec une matrice végétale est considérée comme étant un paramètre clé pour renforcer la fonctionnalité des souches probiotiques et de protéger ces bactéries de l'effet délétère de l'oxygène et de ces dérivés actifs (**SPACOVA & al., 2020 ; GÜNEY & al., 2021**).

Différents résultats ont été obtenus concernant les effets des extraits des plantes riches en composés polyphénoliques sur la croissance de bactéries probiotiques et d'autres microorganismes. Il a été prouvé que les extraits de plantes peuvent inhiber la croissance des pathogènes et micro-organismes associés aux aliments responsable de la détérioration des aliments, ainsi que des troubles intestinales microflore pathogène et physiologique. Certains chercheurs indiquent que composés polyphénoliques de différents extraits de plantes peut également avoir un effet négatif sur les bactéries qui sont souhaitable pour la santé humaine (**HADDADIN, 2010**).

Le grenadier (*Punica granatum L*) est un arbuste qui est depuis longtemps convoité en médecine ayurvédique, toutes ses parties, fruits, racines, écorce, pépins sont utilisés pour traiter des maladies, infections, blessures et inflammations. Effectivement, l'écorce de la grenade est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites. Ces propriétés sont dues à la capacité antioxydant de la grenade, celle-ci est due à son abondance en composés phénoliques, tanins, flavonoïdes..., qui sont connus par leur effet bénéfique sur divers systèmes biologiques (**AIT SAID & HAMEG, 2021**).

Aussi l'olivier et sur tous les feuilles leurs utilisation industrielle se limite à l'alimentation animale et à la phytothérapie (**DE LEONARDIS & al., 2008**). Les propriétés bénéfiques des extraits de feuilles d'olivier sont en outre renforcée par la biodisponibilité de leurs polyphénols constituants, qui sont facilement absorbés par le tractus gastro-intestinal, entraînant des niveaux importants dans le système de circulation (**VISIOLI & GALLI, 2000., VISSERS & al., 2002**). En ce qui concerne l'humain, beaucoup de préoccupations ont été axé sur les

composés phénoliques des plantes et des aliments qui peuvent moduler le microbiote dans l'intestin en augmentant sélectivement la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles et diminuant celle des bactéries nocives telles comme *clostridia* (TUCK & HAYBALL, 2002).

Dans le présent travail nous avons orienté notre étude pour évaluer l'effet d'extrait aqueux et hydro-alcoolique des feuilles d'olivier (*Olea europaea L*) et les écorces de grenadier (*Punica granatum L.*) sur l'activité des bactéries probiotiques isolées à partir du la camelin dans la région d'El-Oued.

Cette étude est divisée en deux parties :

La première partie: **Synthèse Bibliographique**, qui contient :

- Les bactéries lactiques.
- Les probiotiques.
- Les plantes *Olea europaea L* et *Punica Granatum*.

La deuxième partie : **Étude expérimentale**, qui réunit :

- Matériel et méthodes
- Résultats et discussions
- Conclusion

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE
UE

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont fréquemment isolées d'environnements riches en matières organiques telles que les végétaux en décomposition mais on retrouve également des représentante de ce groupe dans les tractus gastro-intestinaux et urogénitaux des mammifères (**BECHACHHA & al., 2020**). Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la 1^{ère} fois par Orla –Jensen en 1919, réunit plusieurs genres de différentes morphologies (**BOUMEDIENE, 2013**).

Comme toutes les bactéries, les bactéries lactiques sont des micro-organismes vivants et unicellulaires (procaryotes) très répandus dans la nature car se reproduisant rapidement (**BENGHANEM & al., 2011**). Ce sont des bactéries à Gram positives dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%, organotrophes (**ABABSA, 2012**). Ce sont généralement catalase négative, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative (**ADOUR & DABOUZ, 2016**)

Elles sont immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles. Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 30°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (**BAHRI, 2016**). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**HOGG, 2005**).

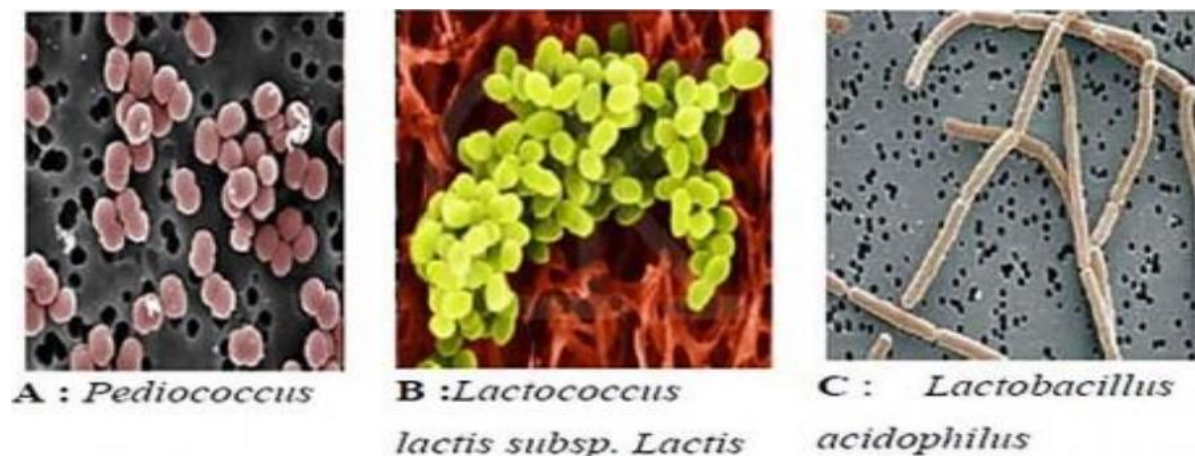


Figure 01 : Bactéries lactiques sous microscope électronique (BELDJILALI & TOUAHRIA, 2021)

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature (BELAIDOUNI, 2017). Elles sont dit ubiquistes : Car on les retrouve dans différentes niches écologiques riches en nutriments comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (ELMEDDAH & LADJAL, 2017). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain (BELAIDOUNI, 2017). Même si elles se développent dans une variété d'habitats, les bactéries lactiques exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leurs croissances (ZERGOUG, 2018).

D'une façon générale, les bactéries lactiques sont présentes partout où il y a de fortes concentrations de glucides, de produits de dégradation des protéines, de vitamines et peu d'oxygène (MARTEAU, 2005).

Tableau 01 : Milieux d'isolement des bactéries lactiques (HASSAINE, 2013)

Bactéries lactiques	Habitat ou milieu d'isolement.
Lactobacillus	
Lb. delbrueckii subsp. Delbrueckii	Végétaux
Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus	Yaourt, fromage

Lb. delbrueckii subsp. Lactis	Lait, fromage
Lb. acidophilus	Bouche, tractus intestinal
Lb. gasseri	Bouche, tractus intestinal
Lb. helveticus	Fromage
Lb. casei subsp. casei	Rumen
Lb. casei subsp. pseudopantarum	Fromage, fourrage
Lb. casei subsp. tolerans	Bouche
Lb. casei subsp. rhamnosus	Tractus intestinal
Lb. sake	Végétaux, produits carnés
Lb. curvatus	Végétaux, produits carnés, lait
Lb. bavaricus	Végétaux
Lb. plantarum	Végétaux, fromage, produits carnés, bouche
Lb. bif fermentans	Fromage
Lb. brevis	Végétaux, lait, fromage, tractus intestinal
Lb. buchneri	Végétaux, lait, fromage, bouche
Lb. kefir	Kéfir
Lb. renteri	Tractus intestinal, produits carnés
Lb. fermentum	Végétaux, fromage, bouche
Lb. confusus	Végétaux
Lb. viridescens	Produits carnés
Lb. Sanfrancisco	Pain
Lactococcus	
Lc. lactis subsp. Lactis	Lait cru, laits fermentés, végétaux
Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis	Végétaux, lait
Lc. lactis subsp. cremoris	
Lc. raffinolactis	
Lc. garviae	
Leuconostoc	
Lait, produits laitiers, fruits, légumes, végétaux en fermentation (choucroute), produits de panification, Solutions visqueuses de sucres.	
Ln. oenos	
Pediococcus	
Végétaux, boissons (bière, cidre et vin)	
Pc. pentosaceus, Pc. acidilactici	
Matières végétales, lait et produits laitiers	

<p>Pc. Halophilus</p> <p>Streptococcus thermophilus</p>	<p>Produits de pêche, anchois salé</p> <p>Lait, produits laitiers, yaourt, levains artisanaux</p>
---	---

I.3. Taxonomie et Classification

Depuis la description du genre *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (TAHLAITI, 2019).

La classification des bactéries, des levures, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell (COLWELL, 1970), qui a introduit ce terme en se référant à une taxonomie basée sur un ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (POT, 2008).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur elle est basé sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques, et physiologiques (KRIEG, 2001) (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (ABDELALI & BOUHALI, 2021). Les marqueurs chimio-taxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (BESSILA & MESSAOUDI, 2021).

L'approche classique de la taxonomie bactérienne était basée sur la morphologie et la physiologie caractéristiques. Cela a été élargi pour inclure la cellule composition de la paroi, acides gras cellulaires, isoprénoïde quinones et autres caractéristiques des cellules (Stiles & Holzapfel, 1997). Moderne classification basé sur l'hybridation ADN / ADN, puis des structures

et des séquences d'ARN ribosomiaux (MAKHLOUFI, 2011). Elle a permis de regrouper des espèces (BESSILA & MESSAOUDI, 2021).

Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. Casei Pediococcus* (RODRIGUES & al., 1991).

Tableau 02: Classification des grands groupes de bactéries lactiques (STILES & HOLZAPFEL, 1997).

Famille	Formes	Catalase	Nitrate réductase	Fermentation	Genres bactériens
Beta bacterium	Bacille	-	-	Hétérofermentaire	Lactobacillus Weissella
Thermobacterium	Bacille	-	-	Homofermentaire	Lactobacillus
Streptobacterium	Bacille	-	-	Homofermentaire	Lactobacillus Carnobacterium
Streptococcus	Coque	-	-	Homofermentaire	Streptococcus Enterococcus Lactococcus Vagococcus
Betacoccus	Coque	-	-	Hétérofermentaire	Leuconostoc Oenococcus Weissella
Tetracoccus	Coque	+	+	Homofermentaire	Pediococcus Tetragenococcus
Bifidobacteria	Polymorph	-	-	Homofermentaire	Bifidobacterium

I.4. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

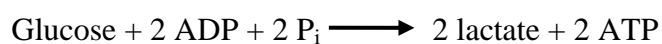
Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose) (BERRADIA, 2016).

En règle générale, le produit final prédominant est l'acide lactique (50% de carbone de sucre). Il est clair, cependant, que les bactéries lactiques s'adaptent à diverses conditions en changeant leur métabolisme par conséquence. Cela peut conduire à former différents modèles de produits finis (AXELSSON, 2004).

Selon les genres ou espèces, Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (ATLAN & al., 2008).

I.4.1. Voie homofermentaires ou EMP

La voie homofermentaire emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glc-6-P jusqu'au pyruvate) et est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, et *Lactobacillus* (TAHLAITI, 2019). Ce métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate. Le fructose-1,6 biphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (THOMPSON & GENTRY-WEEKS., 1994). La réaction bilan est la suivante (AMANDINE, 2017) :

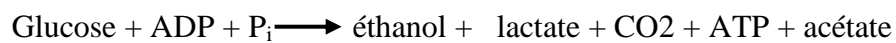


I.4.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Au moins 50%, mais pas plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits issus de cette transformation sont : l'acide acétique, du CO₂ et éventuellement de l'alcool (GOY & al., 2015).

Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles. Ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol (SALMINEN & *al.*, 2004).

Le bilan de la réaction est le suivant (AMANDINE, 2017) :



I.4.3. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- cétolase)

Cette voie est empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*, elle permet d'avoir 1.5 molécules d'acétate et 2.5 molécules d'ATP à partir d'une molécule d'hexose consommée (TAHLAITI, 2019).

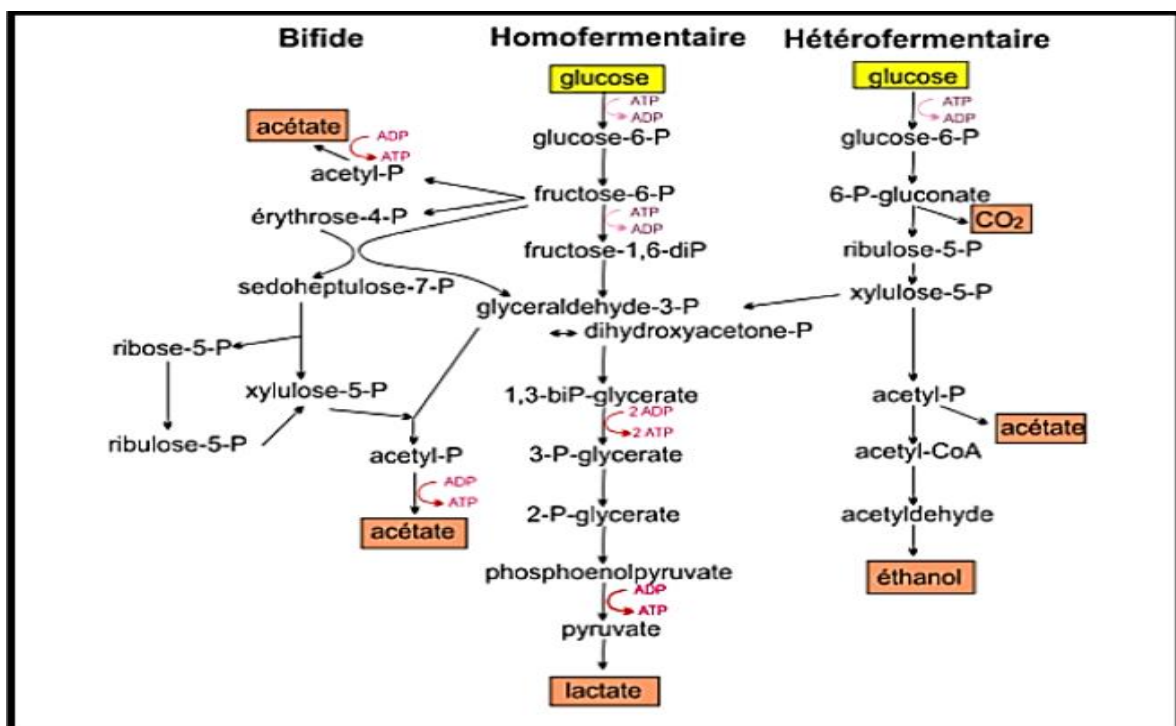


Figure 02 : Principales voies fermentaires des bactéries lactiques (DRIDER & *al.*, 2009)

I.5. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans plusieurs domaines sur toute l'industrie alimentaire et le domaine thérapeutique.

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation. Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant des métabolites ayant une activité antimicrobienne (TAHLAITI, 2019).

I.5.1. Dans l'industrie alimentaire

Voilà au moins quatre mille ans que l'homme se sert des bactéries lactiques pour la fermentation d'aliments. Ces bactéries sont utilisées dans le monde entier, en particulier dans les laitages fermentés comme par exemple le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre, le kéfir et le koumis (MAGHNIA, 2011).

Les souches de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont utilisés pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (YATEEM & al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain sont entre autres des produits de fermentation des bactéries lactiques (ZERGOUG, 2018).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production des produits fermentés. Le premier rôle, intervient dans le changement de la saveur et la texture de l'aliment, grâce à l'acide lactique sécrété par les bactéries lactiques tout au cours de leur croissance. Les bactéries lactiques produisent ainsi des peptides et des molécules comme l'acétone, l'acétaldéhyde, le diacétyl ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments (BELHADJ, 2020). En production laitière, la fermentation lactique joue un rôle primordial, c'est-à-dire, les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (PILET & al., 2005). Ces ferments assurent plusieurs fonctions, telles que la protéolyse qui donne aux fromages leurs caractères rhéologiques (viscosité, plasticité et l'élasticité) et la production des agents épaississants pour améliorer la texture du fromage (BELHADJ, 2020).

I.5.2. Dans le domaine thérapeutique

Dans le domaine de santé, les bactéries lactiques sont utilisées comme des probiotiques, c'est-à-dire qu'elles exercent un effet bénéfique par l'amélioration de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal. Les espèces classifiées comme probiotique sont : *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. jhonsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (SALMINEN & al., 2004), et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (YATEEM & al, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (MKRTCHYAN & al, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (HADDAD & al, 2020). Cependant, depuis quelques années, l'usage des bactéries lactiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites) (ESSMA, 2019) également dans l'élaboration des vaccins (CALVEZ & al, 2009), la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires à empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie, ainsi que des problèmes liés aux infections urinaires (ESSMA, 2019)

II. Les Probiotiques

2. Historique et définition

Au début du XX^{ème} siècle, Elie Metchnikoff, savant ukrainien naturalisé français ayant travaillé à l'Institut Pasteur et prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur la phagocytose, a été le premier à observer l'effet positif de certaines bactéries sur l'homme. Metchnikoff supposa alors que « la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore de nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles » (BOUGADDIMA & SEBAHA, 2019).

Fuller (1989), afin de souligner la nature microbienne des probiotiques, a redéfini le mot comme « un complément alimentaire microbien vivant qui affecte de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal ». Une définition similaire a été proposée par Havenaar et Huis in 't Veld (1992), « une culture mono ou mixte viable de bactéries qui, lorsqu'elle est appliquée à l'animal ou à l'homme, affecte avantageusement l'hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène » (FAO, 2002).

Ainsi, c'est la Food and Agriculture Organisation (FAO) des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) qui, en 2001, officialisent la définition du terme "probiotique " afin d'éviter des abus de langage et des dérives. Les probiotiques sont donc définis comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte »(**PIQUEPAILLE, 2013**).

Le terme probiotique provient de la langue grecque et veut dire (pour la vie) et les probiotiques sont aujourd'hui définis comme: « Microorganisme vivant qui, lorsque administré en quantité adéquate, procurent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte », en améliorant les propriétés de sa flore intestinale. Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentés soit dans des aliments, notamment les produit laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaire sous forme lyophilisée (**MAHMOUDI, 2014**).

La majorité des bactéries probiotiques aujourd'hui sur le marché international, sont majoritairement des bactéries lactiques (BL) et plus particulièrement des bifidobactéries ou des lactobacilles (**KECHAOU, 2012**)

La définition actuelle pourrait encore évoluer, car les champs de recherche pour mieux connaître et comprendre l'action des probiotiques sont encore nombreux (**PIQUEPAILLE, 2013**).

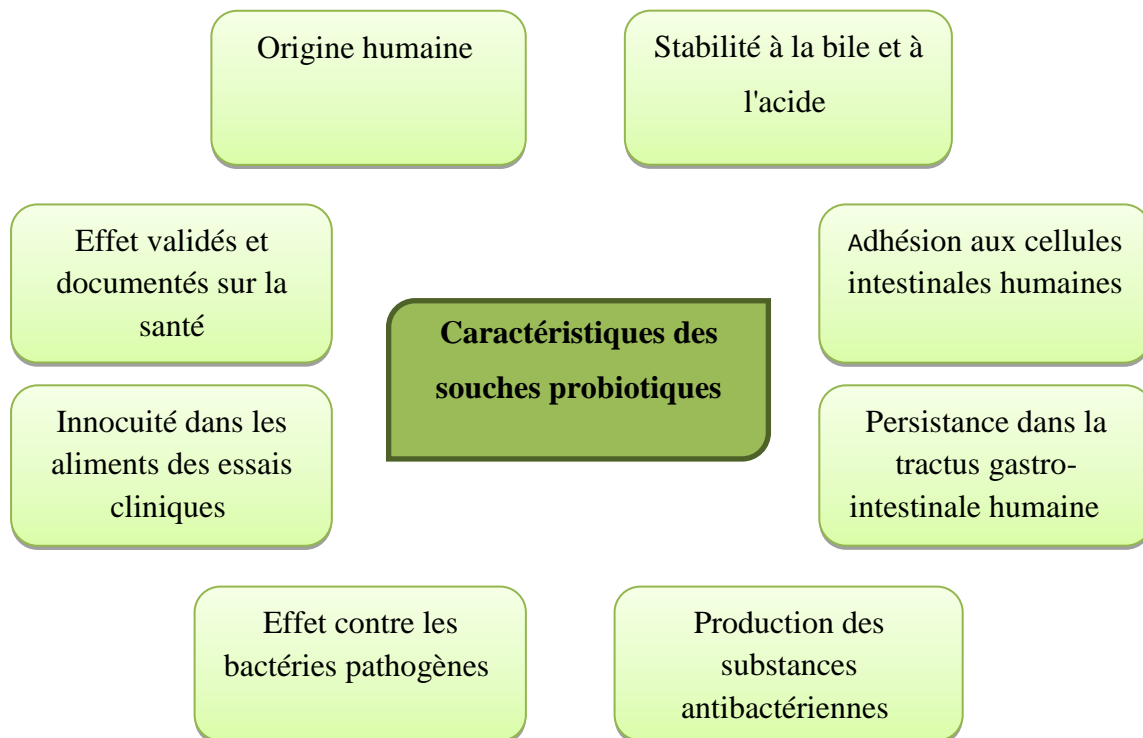


Figure 03: les caractéristiques des souches probiotiques (DA SILVA HEIL, 2013)

3. Notion complémentaire

a. Prébiotique

Les prébiotiques sont des substances alimentaires non digestible (BODINIER, 2019). Ils consistent surtout en polysaccharides à l'exclusion de l'amidon et oligosaccharides non digestibles par les enzymes humaines, qui nourrissent un group sélectif de microorganismes vivant dans l'intestin. Ils stimulent la croissance des bactéries à effet positif aux dépens des autres à effets négatifs (THOMSON & *al.*, 2011).

En plus de nourrir vos bonnes bactéries intestinales, les prébiotiques peuvent:

- ✓ Vous aidez à absorber le calcium
- ✓ Modifier la vitesse à laquelle les aliments provoquent des pics de sucre dans le sang (l'indice glycémique)
- ✓ Fermentez les aliments plus rapidement, de sorte qu'ils passent moins de temps dans votre système digestif. Cela vous aide à ne pas être constipé.
- ✓ Gardez les cellules qui tapissent votre intestin en bonne santé (COLLINS, 2020).

b. Postbiotique

Il est utilisé pour désigner des produits bactériens non viables ou les sous-produits métaboliques élaborés par des microorganismes probiotiques ayant une activité biologique chez l'hôte. En général, les postbiotiques comprennent les métabolites bactériens, les sous-produits, tels que les bactériocines, les acides organiques, l'éthanol, le diacétyle, l'acétaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène (ZIELINSKA & KOLOZYN-KRAJEWSKA, 2018).

c. Parabiotique

Les « paraprotbiotiques » ou probiotiques inactivés, désignent les microorganismes non viables qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent des avantages aux consommateurs. Les paraprotbiotiques conservent leur activité immun-modulatrice au-delà de leur viabilité cellulaire qui semble être associés aux composants de la structure des cellules mortes, principalement les constituants de la paroi cellulaire (BOUGUERRA, 2020)

d. Symbiotiques

Les symbiotiques sont des associations appropriées de probiotiques et de prébiotiques le prébiotique va favoriser le développement du probiotique et ainsi potentialiser l'effet bénéfique de ce dernier sur la santé (LAFFARGUE, 2015)

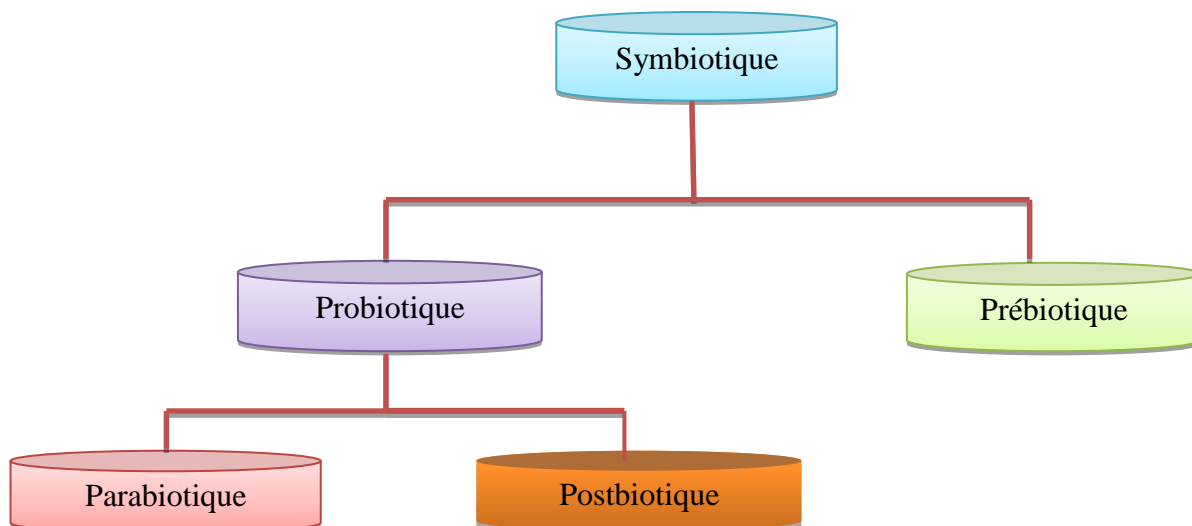


Figure 04: Représentation schématique de la terminologie relative aux probiotiques (BOUGUERRA, 2021)

2. Principaux souches bactérienne

Les microorganismes probiotiques sont en majorité des bactéries lactiques (AZIZI & BOUCHICHA, 2019). Les probiotiques peuvent être classés en cinq catégories (NAÏMI, 2014):

a. La première catégorie renferme les espèces du genre *Lactobacillus*, Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positif, classées dans le phylum des Firmicutes et appartenant à la famille de *Lactobacillaceae* (HAMMES & VOGEL, 1995). Elles se présentent sous forme de bacilles ou de coques et sont anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés et non sporogènes. Ces espèces colonisent l'être humain et sont généralement présentes dans le tractus gastro-intestinal, les muqueuses vaginales et la cavité buccale (LAND & al, 2005), Les lactobacilles sont les probiotiques les plus utilisés chez l'humain avec plus d'applications connues notamment la fabrication des produits laitiers fermentés tel que le yogourt (KLAENHAMMER, 1998).

b. La deuxième catégorie est composée des espèces de *Bifidobacterium*. Les bifidobactéries sont des bacilles à Gram positif appartenant au genre *Bifidobacterium*, anaérobies stricts, non sporulés, de forme irrégulière, comportant souvent des ramifications. Ces bactéries glucidolytiques dégradent les hexoses par une voie particulière : la voie du fructose-6-phosphate (BUTEL, 2015). , Les bifidobactéries sont majoritairement utilisées comme probiotiques surtout par l'industrie agroalimentaire en raison de leurs nombreux bienfaits sur la santé. C'est le cas de la souche commerciale *B. animalis ssp. lactis Bb1* (KABEERDOSS & al, 2011).

c. Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques tels que les *Enterococcus* et les *Streptococcus* (NAÏMI, 2014). Ces bactéries sont couramment utilisées dans l'industrie laitière pour la fabrication de produits fermentés. Ils sont importants pour empêcher la croissance des bactéries pathogènes dans les produits laitiers en raison de leur pouvoir acidifiant. Bien que non pathogène, une seule espèce est employée pour ses effets bénéfiques sur la santé en tant que micro-organisme probiotique (CARMONA, 2017).

d. le quatrième groupe sont les autres bactéries non lactique, dont le métabolisme est différent des précédentes, font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli Nissle 1917* et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis* et *B. cereus* (PIQUEPAILLE, 2013)

e. la dernière catégorie est levure qui est des champignons unicellulaires, utilisés dans l'industrie alimentaire pour la production de boissons alcoolisées (fermentation alcoolique), telles que la bière, le vin, l'alcool industriel et le saké mais également dans la fabrication du pain (panification) (STEENSELS & al, 2014). Les levures actuellement employées comme

probiotique dans les produits pharmaceutiques (compléments alimentaires ou médicaments) appartiennent au genre *Saccharomyces* et sont peu nombreuses. Il s'agit, de la souche *Saccharomyces cerevisiae* mais plus particulièrement *Saccharomyces cerevisiae* variété *bouardii* (MOSLEHI-JENABIAN & al, 2010).

Tableau 03: Principaux probiotiques utilisés chez l'humain (PYAR & al, 2013)

Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres
<i>L. acetotolerans</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. acidifarinae</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. agilis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>B. boum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. choerium</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. coryneforme</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. gallicum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>B. gallinarum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. indicum</i>	<i>Streptococcus phocae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces bouardii</i> (levure)

3. Mécanisme action de probiotique

Plusieurs mécanismes par certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire (NAÏMI, 2014)

4.1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes

Phénomène de compétition / exclusion Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales (VANDERPOOL & al, 2008).

En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion aux parois de l'intestin. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes. Ce phénomène a été observé chez certains lactobacilles qui adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes (**ROSELLI & al, 2006**).

4.2. Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des pathogènes en exercent une action antimicrobienne indirecte. Cette dernière se réalise grâce à la production de différents composés antimicrobiens.

Ce sont des composés protéiques qui ralentissent respectivement les invasions des souches bactériennes (**KLAENHAMMER, 1993**). Ces substances nocives produites par les probiotiques sont dirigées contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée. Les lactobacilles et les lactocoques, contrairement aux souches de bifidobactéries, sont le plus souvent associés à la production de bactériocines (**FOOKS & GIBSON, 2002**).

Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition de la croissance des microorganismes entérovirulants (**SERVIN, 2004**).

Certaines bactéries lactiques produisent, en milieu humide, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes (**OUWEHAND & VESTERLUND, 2004**).

4.3. Effets immuno-modulateurs

Les probiotiques peuvent également favoriser l'inhibition de l'agent pathogène par induction de la production des cytokines ou augmentation de la sécrétion d'IgA in situ (**YADAV & SHUKLA, 2017**). L'autre mécanisme d'action pertinent associé aux probiotiques comprend leur capacité à moduler le système immunitaire. Il implique l'activation des cellules du tissu lymphoïde associé à l'intestin, présent dans la lamina propria et la sous-muqueuse (**PINTADO &**

al, 2014). En effet, l'interaction des probiotiques avec différentes cellules du système immunitaire [entérocytes, cellules dendritiques (CD), Th1, Th2 et T cellules régulatrices] dans l'intestin, module la réponse immunitaire vers une action pro ou anti-inflammatoire (ROSSONI & *al*, 2020). Certains probiotiques possèdent des propriétés antiallergiques après induction des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β ou réduction de la prolifération des cellules T (BOUGUERRA, 2021).

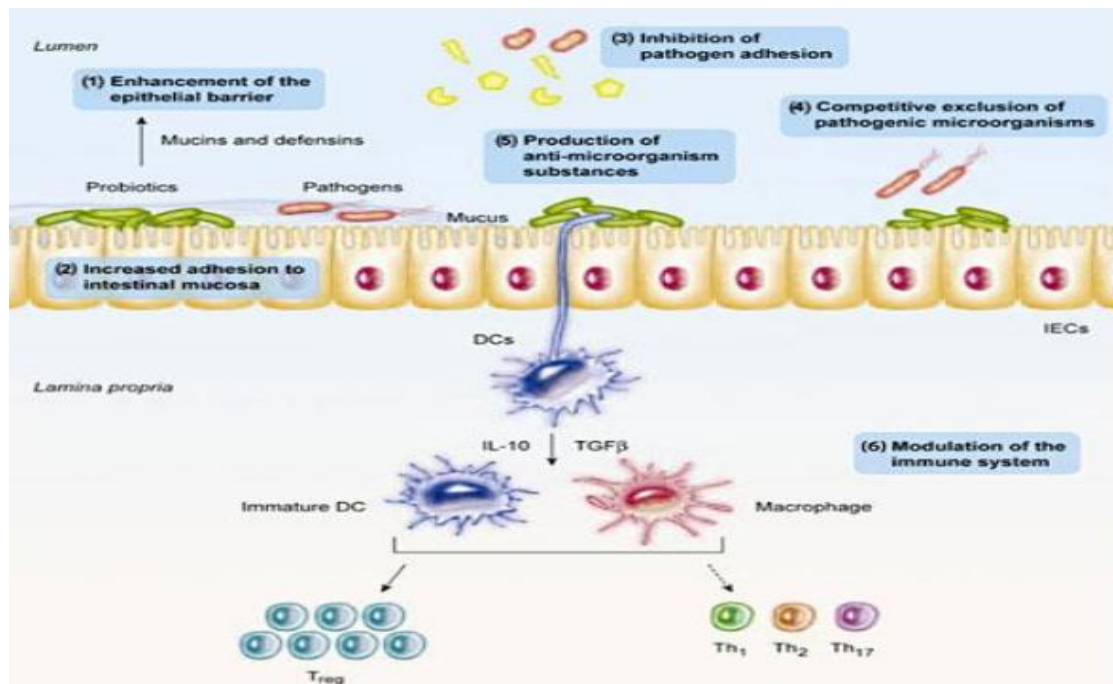


Figure 05: Mécanismes d'action majeurs des probiotiques (BERMUDEZ-BRITO & *al*, 2012).

4. Effets bénéfiques sur la santé humaine

On a plusieurs effets bénéfiques des probiotique sur la santé :

Tableau 04: Les principaux effets bénéfiques attribuées aux probiotiques (**ZEHRI & KHOUBZI , 2020**)

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autre
Contrôle des troubles suivants : -Mauvaise digestion du lactose -Diarrhée due aux rota virus et diarrhée -associée aux antibiotiques -Syndrome du côlon irritable -Constipation -Infection par <i>Helicobacter pylori</i> -Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle -Maladies inflammatoire chroniques de l'intestin -Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né	-Modulation immunitaire -répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation -réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>salmonella, shigella</i>)	Réduction du risque de : -Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) -Coronaropathie -Maladie des voies urinaires -Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

III. *Olea europaea* L et *Punica Granatum*

III.1. L'olivier (*Olea europaea* L)

III.1.1. Définition

Olea europaea L, Appartenant à la famille des oléacées, est 'un arbre polymorphe, de taille moyenne, très rameux, au tronc noueux, au bois dur et dense, à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre quinze à vingt mètres de hauteur, et vivre très longtemps. Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante et un sol aéré (MORZOUGLAL & RABOUH, 2019).

L'Olivier est l'un des plus vieux arbres cultivé au monde et représente une culture typique de la région méditerranéenne (SCOGNAMIGLIO & al, 2012), se caractérise par un fruit, l'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen (GHEDIRA, 2008). De nombreuses preuves scientifiques mettent en évidence le rôle joué par *O. europaea* dans la prévention et la gestion de plusieurs maladies (BENMESSAOUD, 2019).

III.1.2. Classification botanique

L'olivier appartient plante dicotylédone, à la famille des Oléacées. Son genre est appelé "Olea", qui comprennent 900 espèces réparties en 25 genres (GAUSSORGUES, 2009). On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa.*) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris.*). Elle est un arbre à feuilles persistantes et une source naturelle de polyphénol (SAHRAOUI & HABARA, 2019). La classification botanique d'arbre d'olivier selon GHEDIRA (2008), est comme suit :

Tableau 05 : Classification de l'espèce d'*Olea europaea* L

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	Dialypétales
Ordre	Lamiales
Famille	Oléacées
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea</i> L

III.1.3. Caractères botaniques

Olea europaea L. est une plante pérenne, diploïde ($2n=2x=46$) qui peut atteindre quinze à vingt mètres, caractérisée par une longue longévité qui peut atteindre les 2000 ans (LEWINGTON & PARKER, 1999 ; MINELLI & al, 2000). Elle est un arbre vivace au feuilles persistantes, dur, gris-vert et ayant une forme allongée (METZIDAKIS, 1997), elle se compose de deux parties : une partie aérienne et l'autre racinaire.

Le tronc est le plus souvent élancé (ARGENSON & al, 1999), circulaire puis il se déforme, gris-vert et lisse jusqu'à sa dixième année, il prend une couleur gris foncé (RUGINI & al, 1998). Elle est présent une cime arrondie avec une rameaux étalés (ARGENSON & al, 1999). Ses fleurs elles sont regroupées en petite grappes (de 10 à 40 en moyenne suivant la variété) dressées à l'aisselle des feuilles, elles sont petites et ovales. Les pétales sont de couleur blanche jaunâtre, très largement, odorant (SAAD, 2009 ; FABBRI & BENELLI, 2000).

Les feuilles sont opposées, coriaces, simples, entières, subsessiles avec un pétiole court. Le limbe est lancéolé et se termine par un mucron. Les bords du limbe s'enroulent sur eux- mêmes. La face supérieure de la feuille est vert- grisâtre, lisse et brillante (ARGENSON & al, 1999).



Figure 06 : Les composés botaniques d'*Olea europaea* L (PHOTO ORIGINAL, 2022, BOUBENDDIR & TITI, 2021, BENAÏSSA & ZAÏDI, 2021)

III.1.4. Composition phytochimique

Les principaux composants de l'olive et de l'huile sont : les acides gras insaturés (acide oléique...), les protéines, glucides, cellulose, flavones glucosidiques (oléoside, oleuro-péine), carotène, enzymes, de nombreux éléments minéraux (calcium, soufre, phosphore...), vitamines A, C... ; tandis que les feuilles d'olivier sont une source importante de composés phénoliques bioactifs (LEE & *al.*, 2009). Cette teneur change selon l'âge, l'origine, les conditions climatiques, et la variété...etc. (BRAHMI & *al.*, 2012). Les feuilles d'olivier sont riches en : flavonoïdes (lutéoline, quercétine...), les secoiridoïdes (oleuro-péine, ligstroside...), les acides phénoliques tel que l'acide caféique, acide coumarique et l'orogénique (RYAN & *al.*, 2002 ; KHAN & *al.*, 2007) et terpénoïdes (acide oléanolique) et des alcools phénoliques tel que : tyrosol et hydroxytyrosoles qui est bien connu ils sont les principaux constituants phénoliques des feuilles d'olivier, qui seraient responsables de leurs effets pharmacologiques (BENCHEIKH, 2017).

III.1.5. Domaines utilisations

Plusieurs rapports ont montré que l'extrait de feuille d'olivier avait la capacité d'abaisser la tension artérielle chez les animaux (SAMUELSSON, 1951) et d'augmenter le débit sanguin

dans les artères coronaires (ZARZUELO, 1991), de soulager les arythmies, de prévenir les spasmes musculaires intestinaux, et elle préconisées dans l'hypertension artérielle modérée (GARCIA, 2000), aussi elle possède une autre propriété médicales intéressants : hypoglycémiantes et hypocholestérolémiantes. Récemment plusieurs études ont mis le point sur le contenu des feuilles d'olivier et l'extraction de ces composés à haute valeur ajoutée, d'où leur utilisation dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques.

Ces activités biologiques sont dues à la présence de composés photochimiques possédant des cibles moléculaires précises pouvant atteindre différents processus physiologiques. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les composés photochimiques, principalement les polyphénols pourraient prévenir un grand nombre de pathologies tel que les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires (OTMANI & SLIMANI, 2018).

Olea europaea L, est largement étudiée pour son utilisation alimentaire (les fruits et l'huile sont des composants importants de l'alimentation quotidienne d'une grande partie de la population mondiale) (HANSEN & al, 1996), aussi les feuilles peuvent être utilisées comme ingrédients dans la formulation d'aliments pour les hyper-glycémiques (KOMAKI, 2003). Elles peuvent être aussi utilisées pour la conservation de la viande fraîche de dinde (DJENANE & al, 2012).

III.2. Le grenadier (*Punica Granatum*)

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum*). Ce petit arbre buissonnant est originaire de bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « granatum » qui signifie « fruit à grain ». Le grenadier est mentionné comme un arbre régional symbolique dans le coran (le fruit du paradis) (RUIS, 2015).

Par ailleurs, depuis des milliers d'années, le grenadier est aussi utilisé pour ses propriétés médicinales. Ses fruits, ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés de façon empirique dans les médecines traditionnelles pour le traitement des affections parasitaires et des maladies gastro-intestinales (SITZIA, 2009). Pour cela aujourd'hui, cette plante retient l'attention des chercheurs scientifiques qui lui découvrent des qualités insoupçonnées. En effet, l'élucidation des mécanismes impliqués dans les effets biologiques constatés de cette substance naturelle ou de ses

constituants fait objet de nombreuses études de recherche scientifique, dans le cadre d'une démarche de recherche transrationnelle (BAYOU & KERROUM, 2020).

III.2.1. Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum* L a été décrit par Linné et introduit pour la première fois dans sa classification en 1753, qui a été révisée en 2003, par un groupe de botanistes, « Angiosperme Phylogénie Group » ou APG, donnant naissance à une nouvelle classification phylogénétique (BENKHERBACHE, 2021).

Tableau 06 : classification botanique de *Punica granatum* L

Embranchement	Angiospermes
Sous embranchement	Dicotylédones vraies
Classe	Rosidées
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae (Lythraceae)
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i> L

III.2.2. Description botanique

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant, provient d'un arbre adulte à feuilles caduques ou d'un arbuste à feuilles lancéolées. Ce dernier peut atteindre entre 5 et 10 mètres de hauteur à rameaux nombreux et vivre jusqu'à 200 ans (BENKHERBACHE & BENKHERBACHE, 2021). Le tronc du grenadier est tortueux, à l'écorce grise, se ramifie rapidement pour donner au grenadier une belle forme arrondie (GARNIER & al, 1961).

Ses fleurs axillaires, solitaires ou parfois disposées par deux, présentent un calice épais, coriace, tubuleux et turbiné à 6 lobes triangulaires. La corolle d'un rouge éclatant est formée de 5 à 7 pétales obovales sont rouge vif, de 3 cm de diamètre et ayant cinq pétales (Al-HIJNA, 2017), et le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation (GARNIER & al., 1961).

Les fruits mûrs de *Punica granatum* L mesurent environ cinq pouces de large avec une peau rouge foncé et coriace, une grenade en forme de calice pointu. Le fruit contient de nombreuses graines séparées par un péricarpe membraneux blanc. Chaque graine est entourée de

tarte et de jus rouge, et d'une croissance assez lente (Ahouche & Azouzi, 2019), et il recouvert par d'une écorce est la partie externe et dure du fruit. La couleur de la face extérieure dépend de la variété, brillants, la face intérieure généralement jaunâtre, concave, portant l'empreinte des graines qui y étaient appliquées, de saveur amère et astringente (AL-HIJNA, 2017).

Le système racinaire du grenadier, d'une surface d'environ 60 cm², a la capacité à s'adapter selon les conditions de sol. Il est fasciculé et dispose d'une racine ligneuse, noueuse, dure et pesante (BAYOU & KERROUM, 2020).

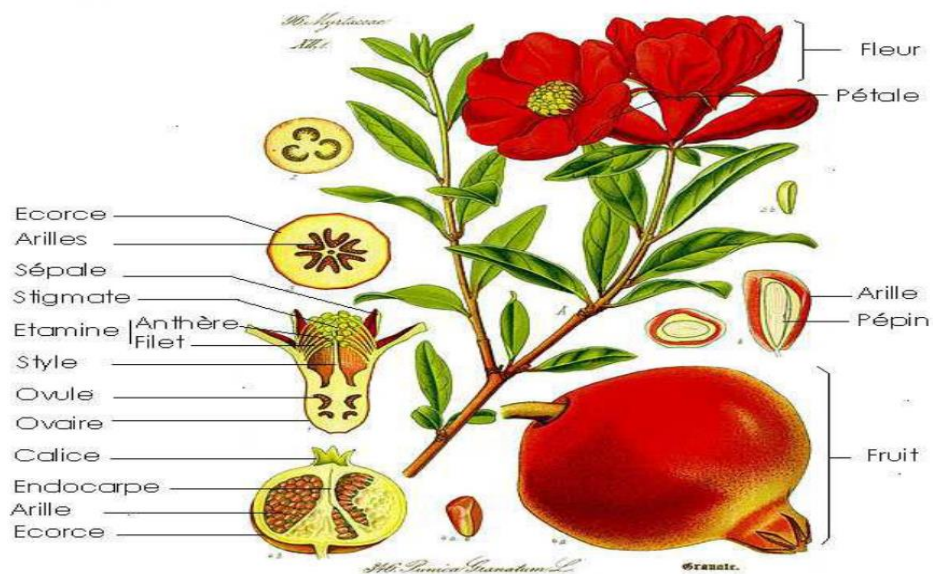


Figure 07 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum* L) (Zatoun & Ghanem, 2017)

III.2.3. Composition phytochimique du *Punica Granatum* L

La grenade possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée: écorce, membranes blanches, arilles et graines (CALIN SANCHEZ & al, 2005). Des recherches actuelles semblent indiquer que les principaux constituants thérapeutiques du grenadier sont les ellagitanins (incluant les punicalagins), l'acide punique, les flavonoïdes, les anthocyanidines, les anthocyanines, les flavonols oestrogéniques et les flavones (ACHOUCE & AZOUZI, 2019). La grenade contient également de nombreux oligo-éléments: les alcaloïdes, ainsi que la présence des sucres, des acides organiques, des acides aminés, des stéroïdes et minéraux, tels que le potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre (BAYOU & KERROUM, 2020 ; DOUAOURI, 2018).

En outre, la composition chimique du grenadier dépend du cultivar, de la région de culture, des conditions pédoclimatiques, du stade de maturité du fruit et des pratiques culturales **(DOUAOURI, 2018)**.

III.2.4. Utilisations des *Punica Granatum L*

Selon **(AL-YAHYA, 2005)**, l'extrait aqueux de l'écorce de grenade *Punica granatum* contient des substances qui réduisent la diarrhée par inhibition de la motilité intestinale ainsi que l'accumulation de fluide intestinales. Les écorces du fruit sont utilisées aussi contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de la pharmacopée française depuis 1937 **(CUTRAY & al, 2008)**.

En plus, il possède un Propriétés d'activité antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérienne, antidiabétique et une action cicatrisante **(CHAHNEZ, 2013)**. Par ailleurs, certaines études démontrent l'efficacité du jus et des polyphénols présents dans le fruit du grenadier contre les infections virales d'origine alimentaires ainsi qu'un potentiel pour la prévention ou la réduction des infections à norovirus humains. Le jus rafraîchissant du fruit de *Punica granatum L.* est recommandé pour guérir les maladies de la vésicule biliaire. Le fruit contient un tannin fort considéré comme une nutrition amère a rapporté que 80% de l'extrait méthanoïque de l'écorce du fruit est un puissant inhibiteur de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia Coli*, et *Yersinia enterocolitica*. **(DOUAOURI, 2018)**.

La grenade dans ce domaine pour la conservation des produits carnés, stabilisation de l'huile de tournesol, et formulation d'un jus moins sucré **(BENKHERBACHE & BENKHERBACHE, 2021)**.

PARTIE EXPREMENTAL

Premier Chapitre

Matériel

Et

Méthodes

Chapitre I. Matériels et Méthodes

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biochimie, Faculté de sciences de la nature et de la vie, Université El- chahide Hamma Lakhdar El oued, Algérie. L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet d'un extrait végétal sur l'activité des bactéries probiotiques déjà isolées à partir du lait camelin.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

A travers ce travail, on a étudié deux plante (*Olea europaea* et *Punica granatum*), on a utilisé la partie aérienne (feuilles) de *Olea europaea* et les écores de *Punica granatum* (*Pomegranate peel*). Les deux plantes ont été récoltées dans deux régions différentes, région d'El Meghair pour *Olea europaea* et région d'Ourmas wilaya d'Oued, au mois de Février 2022.



Figure 08 : *Olea europaea* et *Punica granatum* (photo originale, 2022)

1.2. Matériel biologique

1.2.1. Lait de chamelle

L'échantillon de lait a été aseptiquement prélevé à partir de chamelle (*Camelus dromedarius*) de région **Chegua (EL-MEGHAIER)** au cours du mois de Février 2022. Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis rinçage à l'eau javellisée. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. Le lait (150 ml) a été recueilli dans un flacon en verre de 250 ml stérile contenant le lait placés dans une glacière avec des autres réfrigérées. Afin d'assurer une température de 4°C au cours du transport jusqu'au laboratoire où il est analysé.

1.2.2. Les bactéries pathogènes

Pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches lactiques, trois (03) bactéries pathogènes ont été utilisées.

Tableau 07: Souches cibles utilisées et leur origine (DOUADI & KHALF, 2018)

Souche	Gram	Référence	Origine
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC 25922	Institut Pasteur
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC 27853	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC 25923	

1.3. Milieu de culture

- ✚ **Gélose M17 (liquide et solide)** : utilisée pour le dénombrement des lactocoques (particulièrement *Lactococcus lactis*) et de *Streptococcus thermophilus* dans les produits laitiers (TERZAGHI & SANDINE, 1975)
- ✚ **Gélose Nutritive**: Ce sont des milieux largement utilisés pour la culture des micro-organismes peu exigeants.

1.4. Réactifs chimiques

Pour l'évaluation des activités des feuilles d'Olive et l'écores de grenade, nous avons utilisé de nombreux produits chimiques et biochimiques du laboratoire de biochimies-université d'El-Oued.

Tableau 08 : liste des produits chimiques et biochimiques

Produits	Forme	Forme chimique
Trichloride d'Aluminium	Poudre	AlCl ₃
Hydroxyde Ammonium	Poudre	NH ₄ OH
Catéchine	Poudre	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Vanilline	Poudre	C ₈ H ₈ O ₃
Diméthyle sulfamide	Liquide	C ₂ H ₆ OS

(DMSO)		
Dragendroff réactive	Liquide	/
Ethanol	Liquide	C ₂ H ₅ OH
Fehling liquide	Liquide	/
Folin-Ciocalteu	Liquide	/
Acide Gallique	Powder	C ₇ H ₆ O ₅
Acide Hydrochlorique	Liquide	HCl
Iron. trichloride	Liquide	FeCl ₃
Magnésium chips	/	Mg
Mayer réactive	Liquide	/
Sodium carbonate	Liquide	Na ₂ CO ₃
hydroxyde Sodium	Liquide	NaOH
Acide Sulfurique	Liquide	H ₂ SO ₄
Lugol	Liquide	/
Alcool	Liquide	/
Christelle	Liquide	/
Violet	Liquide	/

1.5. Équipements

Autoclave, Four pasteur, Étuve, Frigidaire, Verreries, Bec Benzène, Rota vapeur, Flacons, Boites de Pétri, Écouvillons. Balance de précision, Spectrophotomètre.

2. Méthode

2.1. Séchage et Broyage

Les feuilles d'*Olea europaea* et l'écorce de fruit de *Punica Granatum* cueillies sont immédiatement rincées à l'eau pour éliminer la poussière et les impuretés. Ensuite, elles sont séchées à l'air libre à l'abri de la lumière pour réduire l'humidité (**Ben Mansour-Gueddes, 2020**) Les deux plantes totalement séchées sont initialement pilonnées pour être finement broyées dans un broyeur électrique. Ce broyage a permis d'obtenir une poudre fine et homogène, et le broyat obtenu a été conservé dans des boîtes en verre à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation (**Merdaci & Taous, 2021**).

2.2. Extraction des composants phénolique

Dans notre étude les composés phénoliques ont été extraits de notre plantes par extraction assistée par Macération, l'extraction est réalisée selon les méthodes de **DIOUF & al, (2009)**; **TUHIN & al, (2016)** avec quelques modifications.

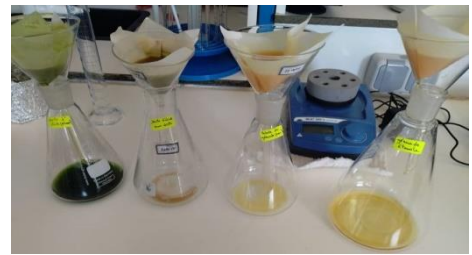
Deux extraits (aqueux et hydro- éthanolique) ont été préparés à partir de feuilles d'olive et l'écore de grenade (*Punica Granatum*) séchées.

- **Préparation de l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique**

Pour obtenir l'extrait aqueux, 10 g de l'échantillon ont été mis en contact avec 300 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer en verre à température ambiante pendant 24h, et aussi pour l'extrait hydroéthanolique : 10 g des matériels végétaux ont été extrait avec 300 ml 80% (éthanol : eau =80:20) dans un erlenmeyer en verre à température ambiante température pendant 24h. Les fioles Erlenmeyer étaient entièrement recouvertes d'une feuille d'aluminium pour prévenir la dégradation des molécules photosensibles. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. L'extrait aqueux est récupéré après filtration à l'aide d'un filtre N°01 papier, l'eau distillée est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur puis étuve pendant au moins 48 heures à température ne dépassant pas 40°C, et conservé jusqu'à utilisation. **DIOUF & al., (2009)**; **TUHIN & al., (2016)**



Macération de poudres végétales



Filtration des extraits

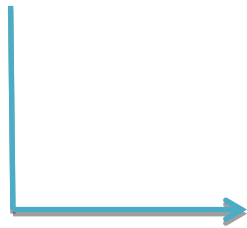


Séchage à l'étuve



Vaporisation des filtrats par le rota

Vapeur

**Figure 09:** Procédés d'extraction assistée par macération

2.3. Rendement

Le rendement d'extraction est calculé en pourcentage du rapport de la masse de l'extrait obtenu sur la masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction selon la formule donnée par (FALLEH & *al*, 2008).

$$R(\%) = M1/M0*100$$

Avec:

R(%): Rendement des extraits en pourcentage.

M1: Masse des extraits hydroéthanolique en (g).

M0: Masse de matière végétale utilisée en (g).

2.4. Caractérisation phytochimique

2.4.1. Tests phytochimiques

Des tests préliminaires ont été effectués selon les méthodes décrites par **KANERIA & al, (2012)**. 100 mg de chaque extrait ont été dissous dans 100 mL de solvant adéquat afin d'obtenir une solution (S). Cette dernière est ajoutée à des réactifs spécifiques pour mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires, dans les deux plantes par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation, de coloration par ces réactifs spécifiques et des observations sous lumière ultra-violette (**NACRI, 2016 ; HAGERMAN & al, 2000**)

a. Les tanins

La réaction avec le trichlorure de fer (FeCl_3) a permis de caractériser les tanins. Un volume de 2 ml de chacun des deux extraits, est additionné à 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une couleur bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins gallique, ou verte plus ou moins foncée qui indique la présence des tanins catéchiques (**KARUMI & al, 2004**)

b. Les alcaloïdes

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCL 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en trois volumes égaux :

- 1^{er} tube : le volume est traité par le réactif de Mayer (précipité blanc jaunâtre).
- 2^{ème} tube : traité par le réactif de Dragendroff (précipité orangé à rouge).
- 3^{ème} tube: traité par le réactif de Wagner (précipité brun) (**MAJOB, 2003**)

c. Les flavonoïdes (réaction de Shibata)

À 5 ml de chaque extrait sont ajoutés 5 ml d'alcool chlorhydrique (4 ml EtOH et 1 ml de HCl concentré), environ 0,5 g de copeaux de magnésium, l'apparition d'un rose, orange ou une coloration rouge violacée se produit lorsqu'il y a des flavonoïdes (flavonols, flavones, flavonones) (**KARUMI & al, 2004**)

d. Les saponines (test de mousse)

Dans un tube à essai, introduire 10 ml de l'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse indique la présence de saponines (**OLOYEDE, 2005**)

e. Les terpénoïdes

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de H₂SO₄ concentrée. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase (**BENINE, 2020**)

f. Les quinones libres

Quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (1% NaOH) sont ajoutées à 5 ml d'extrait. L'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violette indique la présence de quinones libres (**OLOYEDE, 2005**)

g. Les anthraquinones

À 10 ml de chacun de nos extraits, on ajoute 5 ml de NH₄OH à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif (**OLOYEDE, 2005**)

h. Sucres réducteurs

1 ml de liqueur de Fehling est ajouté à 5 ml de chaque extrait et les tubes contenant les mélanges sont chauffés au bain-marie à 40°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique (**FETTAH, 2019**).

i. Glycosides cardiaque

Deux ml de chloroforme sont ajoutés à 1 ml de l'extrait, l'apparition d'une couleur brun rougeâtre après l'addition de H₂SO₄ indique la présence d'hétérosides cardiaques (**BENINE, 2020**).

2.4.2. Dosage des composés phénoliques**a. Dosage des phénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux des quatre extraits (éthanolique et aqueux) de feuille d'olive et écore de grenade a été déterminé selon la méthode de **BOIZOT & CHARPENTIER, (2006)**. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée. Ce réactif est constitué

d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (AMARI, 2015).

Brièvement, 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 µL d'extrait. Après 4 min, 800 µL d'une solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant spectrophotomètre UV. Les teneurs en phénols totaux des extraits sont estimée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (100-1000 µg/mL) et exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g E) (MAYOUF, 2019)

b. Dosage des flavonoïdes

La méthode de QUETTIER-DELEU & al, (2000) est utilisée pour déterminer le flavonoïde contenu de nos échantillons en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif. La méthode est basée sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif, entraînant la formation du flavonoïde-stable complexe d'aluminium de couleur jaunâtre, détectable dans le visible à 430 nm.

Une prise de 1 ml de chaque échantillon (préparé dans le méthanol ou dans l'eau distillée) a été ajoutée à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 430 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine / g de matière végétale sèche en référence à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

c. Dosage des tanins

Le dosage des tanins condensés a été effectué selon la méthode de (SCHOFIELD & al, 2001).

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm). Ainsi, 400µl de chaque extrait ou standard ont été ajouté à 3ml de solution de la vanilline (4% dans méthanol). Ensuite, 1,5ml d'acide chlorhydrique concentré ont été additionnés. Après 15min de réaction, l'absorbance a été lue à 550nm. La concentration des tanins condensés a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0.08-

0,9mg/ml). Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g E) (AMARI, 2015).

2.5. Isolement et identification des bactéries lactiques

2.5.1. Isolement de la flore lactique

Les échantillons des laits sont répartis en tube stériles à raison de 10 ml par tube. Des dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-2}) du lait sont réalisées dans l'eau physiologique à partir de 1 ml de la suspension mère. 1 ml de chaque dilution est ensemencé dans la masse de la gélose nutritive puis les boîtes sont incubées à 37 °C et 45°C dans l'étuve (GUEDDA & BENKHELIFA, 2017)

Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...) sont repiquées sur milieu M17, incubées à 30 ou 45°C afin de s'assurer de la pureté des cultures. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries suivi d'une observation microscopique (LAIRINI & al. 2011).

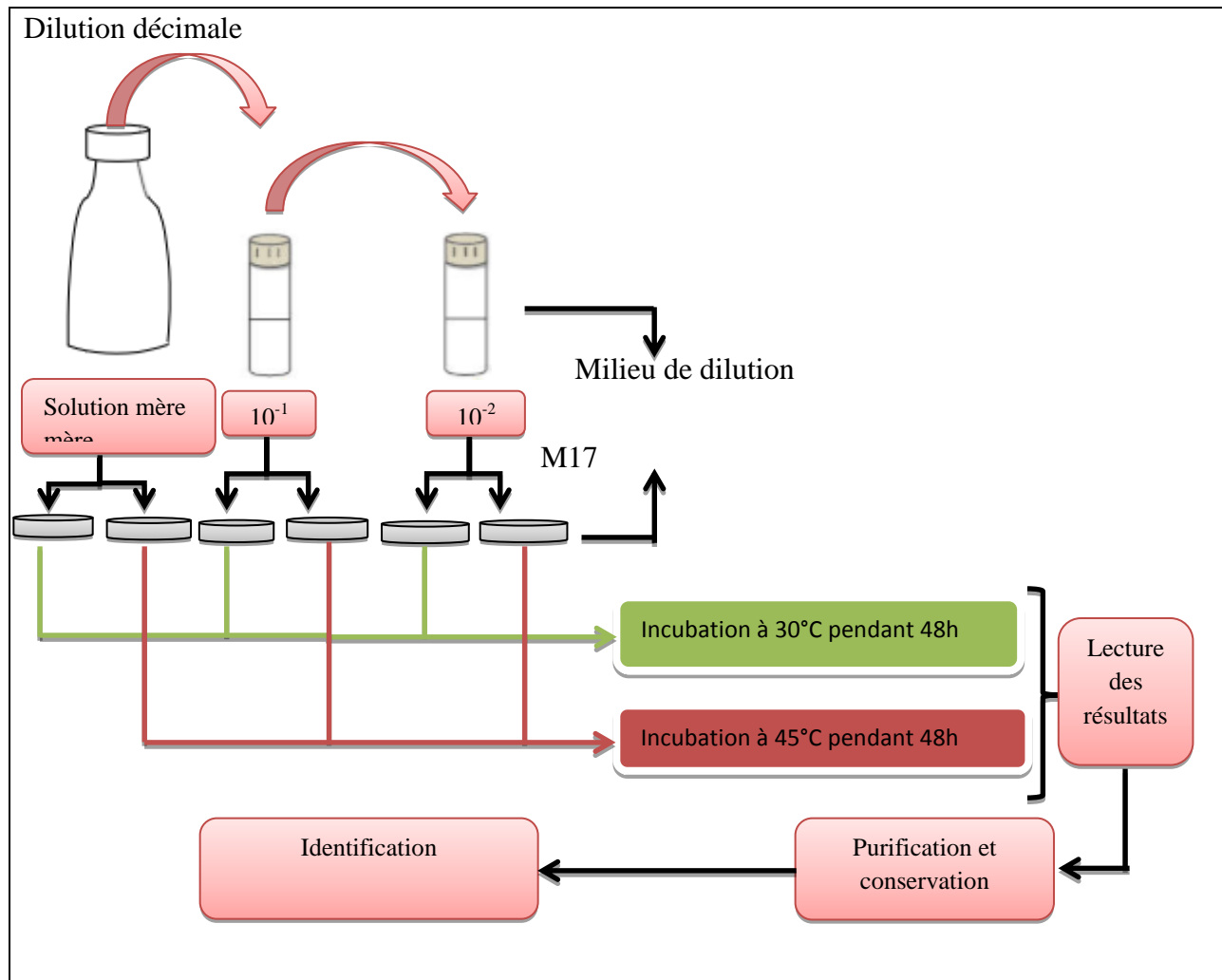


Figure 10: Protocole d'isolement des souches lactiques

2.5.2. Conservation des souches

La conservation colonies isolées, purifiées est réalisée par ensemencement sur la surface milieu de culture MRS gélosé incliné, incubé à une température 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à une température de 4°C, Des repiquages successifs sont réalisés toutes les trois semaines (DAOUADJI & DJELLOUL, 2021).

2.5.3. Pré-Identification des souches bactériennes

a. Examen macroscopique

L'examen macroscopique est porté sur l'observation macroscopique qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, la taille, pigmentation, contour et la viscosité) (CHERRAD & TAZEGOUARET, 2020).

b. Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement (Gx100) a permis de classer les bactéries selon la coloration de Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**JOFFIN & LEYRAL, 1996**).

- **Technique**

- ✓ La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine ou à la pipette stérile puis on étale sur 1 à 2cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- ✓ La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique et les faire adhérer à la lame).
- ✓ La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant 1 min, après rinçage on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes.
- ✓ La quatrième étape à savoir le bain d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram négatives » et décolorer leur cytoplasme), puis on rince avec de l'eau distillé
- ✓ Enfin quelques gouttes de Fuchsine sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1 min, la lame est lavée à l'eau physiologique, après séchage on passe à l'observation microscopique
- ✓ Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement ×100). (**GASMI & KHADRI, 2020**)

c. Identification des souches sélectionnées

- **Tests physiologiques et biochimiques**

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme catalysant la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante:



Cette enzyme est produite par plusieurs microorganismes et utilisée pour l'identification des bactéries. Une colonie isolée est prélevée de la gélose et déposée dans une goutte d'eau

oxygénée sur une lame de verre propre. L'apparition de bulles d'air indique une réponse positive. Les bactéries retenues sont celles dépourvues de catalase (**BOUGUERRA, 2012**).

➤ **Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl**

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) fournit des informations précieuses pour l'identification. Les cultures à tester ont été inoculées sur des bouillons nutritifs à 2% et 4% de NaCl pour *Streptococcus*, *Lactococcus* et 2%, 3%, 4%, et à 6,5% de NaCl pour *Pediococcus*. Après incubation à 30°C pendant 24 à 72 heures, la croissance de ces bactéries se manifeste par une nébulosité du milieu (**SALHI & SOUAKER, 2020**)

➤ **Test des températures**

Il est effectué par ensemencement d'une culture pure et jeune (18 heures) de deux séries de bouillon M17. La première série est incubée à 10°C pendant 7 jours et la seconde à 45°C pendant 24 à 48 heures. Ensuite nous calculons les colonies existant (**LATRECHE, 2016**)

➤ **Galerie API 10S**

Pour quelques tests biochimiques en utilise la galerie API 10S, La galerie API 10 S comporte 10 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste des profils de la notice ou à l'aide d'un logiciel d'identification (**BIOMERIEUX, 2006**).

2.5.4. Sélection des souches probiotiques

a. Tolérance à l'acidité

La résistance des bactéries aux pH acides a été déterminée selon la méthode décrite par **BAKARI & al, (2011)** avec quelques modifications. Elle consiste à:

- Réactiver les souches bactériennes sur un volume de 4ml de bouillon nutritive stérile à 37°C pendant (16 à 18h).
- centrifuger les cultures bactériennes à une vitesse de 2500 pendant 10min puis laver par le tampon PBS

- Recycler la centrifugation de culot à une vitesse de 1000 pendant 5min avec le lavage par le tampon PBS.
- Diviser la quantité de culot en 3 tubes contenant 4ml de bouillon nutritive, ajuster le pH de chaque tube à pH=2, pH=3, pH=4 par HCL et NaOH.
- Après exposition à pH acide à t=0 et t=3h, des dilutions en cascades jusqu'à 10^{-2} ont été réalisées. Ces dilutions sont ensuite ensemencées en masse sur la gélose nutritive et incubées à 37° C pendant 24 à 48 h. Le compte viable a été déterminé à t=0h et après t=3
- Ensuite, nous comptons le nombre de cellules vivantes (**BOUKHALFI, 2020**)

b. Tolérance à la bile

La capacité des souches à survivre dans des conditions similaires de l'intestin grêle de l'homme (stress intestinal simulé) est l'un des caractères importants de sélection des probiotiques (**REN & al, 2014**)

- Réactiver les souches bactériennes sur un volume de 4ml de bouillon nutritive stérile à 37°C pendant (16 à 18h).
- centrifuger les cultures bactériennes à une vitesse de 2500 pendant 10min puis laver par le tampon PBS
- Recycler la centrifugation de culot à une vitesse de 1000 pendant 5min avec le lavage par le tampon PBS.
- Diviser la quantité de culot en 3 tubes contenant 3ml de bouillon nutritive et différentes concentrations de la bile (1%, 3%,5%).
- ensuite ensemencées en masse sur la gélose nutritive et incubées à 37° C pendant 24 à 48 h. Le compte viable a été déterminé à t=0h et après t=3h.

c. Pouvoir antimicrobien

Dans cette partie on réalise des interactions entre les souches isolées de lait et trois bactéries pathogènes de références. Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le tableau 07.

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des pré-cultures des souches lactiques et la pré-culture de la souche indicatrice (pathogène). À partir des tubes inclinés de gélose nutritifs, nous avons ensemencé chacune des souches lactiques isolées dans un tube à essais contenant 3 ml du bouillon nutritifs. Le tube est incubé à 30 et 45°C pendant 18 heures en anaérobiose. Alors

que la souche indicatrice a été ensemencées dans un tube de cœur serval et incubée à 37°C pendant 18 heures (DAOUDI & KHELEF, 2018)

Selon la méthode de diffusion en puits de BAREFOOT & KAENHAMMER, (1983), un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène, puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur la gélose et seront remplis par 60 à 80 µl de surnageant filtré et neutralisé, obtenu après centrifugation à 4000 tours / min pendant 15 min d'une culture de la souche lactique (dans le bouillon nutritif).

Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/2h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures et l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. La figure 12 illustre les étapes de ce protocole (DAOUDI & KHELEF, 2018)

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm. La mesure du diamètre d'inhibition Z_i est effectuée selon la formule suivante:

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

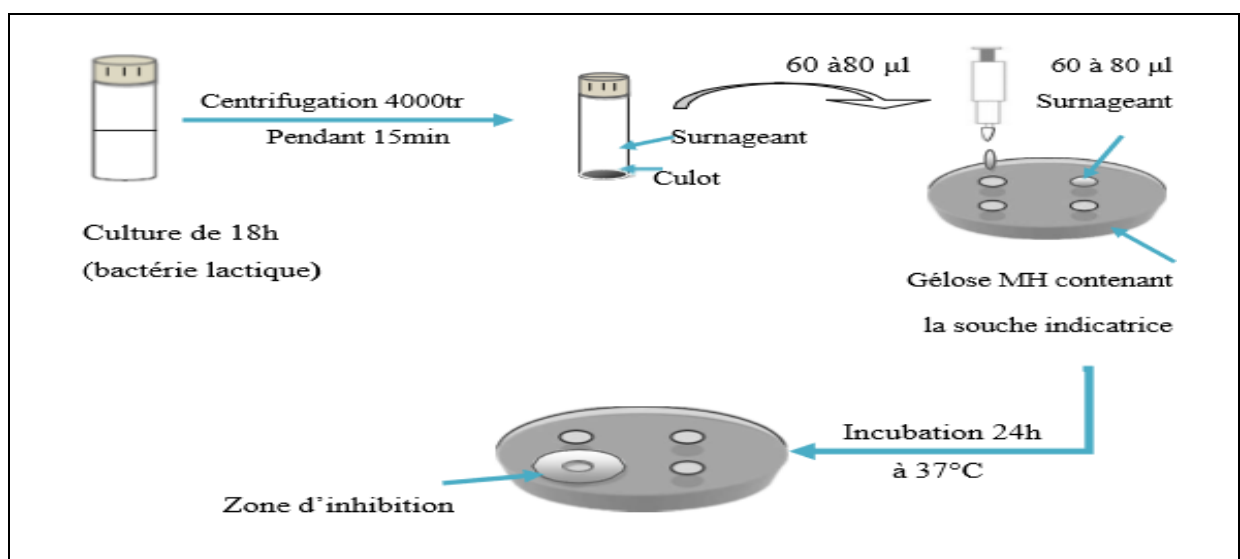


Figure 11 : Méthode utilisée pour la recherche de substances antimicrobienne (DAOUDI & KHELEF, 2018)

d. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité ou la résistance des souches présumées probiotiques aux antibiotiques ont été évaluées selon la méthode décrite par **DEALMEIDA & al, (2015)**. On utilise 08 disques d'antibiotiques.

Tableau 09: Liste des antibiotiques utilisés pour évaluer la sensibilité des souches probiotiques

Antibiotiques	Symbole	Charge du disque
Pénicilline G	P	10 IU
Oxacilline	OXA	5 µg
Amoxicilline	AMX	25 µg
Gentamicine	HLG 120	120 µg
Aztreonam	AT	30 µg
Erythromycine	E	15 µg
Vancomycine	VA 30	30 µg
Ofloxacin	OF	5 µg

Tout d'abord, les souches lactiques sont cultivées sur le milieu gélose nutritifs et incubées à 30 °C pendant 24 h. Ensuite, des colonies bactériennes de chaque souche sont transférées dans l'eau physiologique et leur DO sont ajustées à 0,5 Mc Farland. Ces suspensions bactériennes sont inoculées après dans des boîtes contenant la gélose nutritive par écouvillonnage, puis les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface (à raison de 4 par boîtes). Après incubation des boîtes à 30 °C pendant 48 h, les zones d'inhibition ont été mesurées en incluant le diamètre du disque d'antibiotique (6 mm) dans la largeur de la zone. **(BOUGUERRA, 2020)**

2.6. Etude de l'effet de l'extrait sur les probiotique

Nous avons utilisé quatre extraits; extrait aqueux et alcoolique de chaque plante de concentration 500mg/ml pour étude leur effet sur l'activité probiotique de de *Streptococcus thermophilus*.

2.6.1. Pré-culture

On mélange 50ml de bouillon nutritif avec 2ml de chaque extrait 500mg/ml pour préparation de Pré-culture de *Streptococcus thermophilus* pour chaque test.

2.6.2. Tests biochimique en présence l'extrait végétal

On répète ces tests suivants:

✓ **Test d'acidité et test de sel biliaire,**

Le but des deux tests est l'étude le changement qui serait à *Streptococcus thermophilus* en présence des 4 extraits. *Streptococcus thermophilus* sont incubées avec les extraits et suivent le protocole précédemment adopté, après la croissance des bactéries est étudiée à différents valeurs de ph (2, 3, 4) et à différents concentration de sel biliaire (1%,3%,5%)

a. Test d'antibiotique

Nous faisons ce test pour voir à quel point les *Streptococcus thermophilus* sont résistantes aux antibiotiques en présence de 4 extraits de 500 mg / ml par utilisation des disques antibiotique **tableau 09**.

Dans chaque boîte de Pétri, nous ensemençons *Streptococcus thermophilus* qui ont été incubées dans l'extrait de plante avec bouillon nutritive, ensuite nous mettons les disques et après une incubation de 24 h à 37C°. Nous mesurons le diamètre de la zone d'inhibition.

b. Test d'antimicrobienne

La méthode à utilisation fréquente pour tester l'activité antimicrobienne de *Streptococcus thermophilus* en présence des extraits végétaux, il s'agit de la méthode de la diffusion sur disque. L'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du microorganisme test, puis des mesures de diamètre de la zone d'inhibition doivent être effectuées (**KHAFALLAH & BOUGUERBA, 2021**).

Les souches pathogènes utilisées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), Dans chaque boîte de Pétri, nous mettons 4 disques de 6 mm imbibés surnagent (extrait + *Streptococcus thermophilus*).

Deuxième chapitre

Résultats

Et

Discussion

1. Résultat et discussion d'extraction

1.1. Description des extraits bruts

L'extraction par les solvants est une étape essentielle pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, le choix des solvants d'extraction influence les rendements en métabolites secondaires des extraits. En effet, **KHODDAMI & al, (2013)** ont montré que le éthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques.

L'extraction aqueuse et l'extraction hydro-éthanolique ont été faites après avoir séché la plante à l'ombre et l'avoir rendu en poudre. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (**MARSTON & HOSTETTMANN, 2006**). De plus, les fermentations microbiennes causées par l'humidité peuvent être la cause de cette dégradation (**SEIDEL, 2005**). Le séchage de la plante à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (**JONES & KINGHORN, 2005**). L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage. Selon la méthode de **DIOUF & al, (2009)**; **TUHIN & al, (2016)** avec des modifications, les deux extraits (Aq et hydro étha) de deux plantes ont été préparés par la méthode de macération dans des solvants polaires : l'eau et le éthanol. Les extraits obtenus ont des couleurs et des aspects différents.

Tableau 10: Caractéristiques de chaque extrait préparé de feuille d'*Olea europaea* et pelures de *Punica Granatum*

Les extraits	Feuille d' <i>Olea europaea</i>		L'écorce de <i>Punica Granatum</i>	
	Extrait aqueux	Extrait hydro-éthanolique	Extrait aqueux	Extrait hydro-éthanolique
Aspect	Poudre	Pâte	Poudre	pâte
Couleur	Marron	Vert foncé	Orang	Marron

1.2. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation des solvants, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initial de la plante soumise à l'extraction.

Les extraits bruts des plantes récupérés après évaporation ont été pesés pour déterminer le poids sec obtenu. Les résultats ont été exprimés en pourcentage.

Tableau 11: Rendement des extractions aqueuses et hydro-éthanolique des feuilles d'*Olea europaea* et Pelures de *Punica granatum*

Les plantes	Feuille d' <i>Olea europaea</i>		L'écorce de <i>Punica granatum</i>	
	Solvant eau	Solvant éthanol aqueux (80 :20)	Solvant eau	Solvant éthanol aqueux (80 :20)
Masse de poudre (g)	10	10	10	10
Masse d'extrait	3,33	3,29	3,29	4,1
Rendement (%)	33,3	32,9	32,9	42

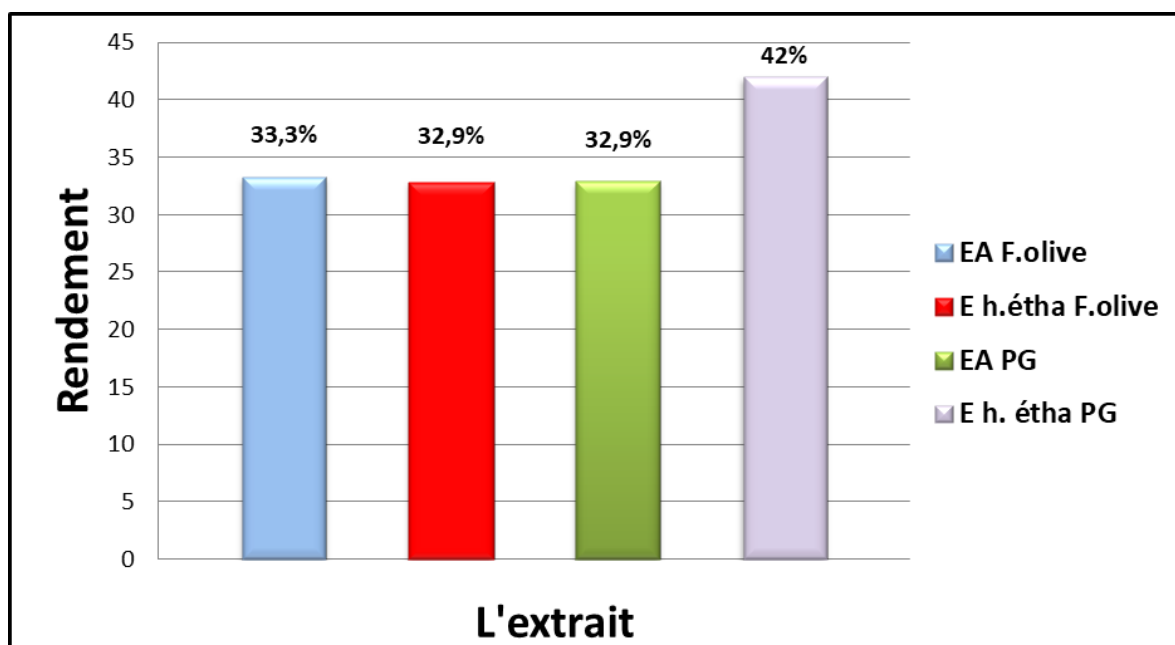


Figure 12: variations des rendements

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-éthanolique des écorces de *Punica granatum* représente un rendement le plus élevé (41%), tandis que l'extrait hydro-éthanolique

d'*Olea europaea* et l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* ont le même rendement de (32,9%), ce qui est considéré comme le plus faible, à la fin, l'extrait aqueux d'*Olea europaea* contient le rendement moyenne (33,3%).

Le rendement dépend de plusieurs paramètres tels que les conditions de séchage de la plante, le broyage, la polarité des solvants et la nature des composés à extraire, le temps d'extraction et la qualité de solvant, la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (BOURGOU, 2016).

La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes. (LEE & al., 2003). L'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans le solvant organique. C'est peut-être la raison pour laquelle les rendements en hydro-éthanolique est supérieurs aux rendements en eau (QUY-DIEM & al, 2014).

2. Tests phytochimiques

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits sont indiqués dans le tableau suivant:

Tableau 12: Résultats des tests phytochimiques des extraits préparés

Métabolites secondaires	Feuille d' <i>Olea europaea</i>		L'écorces de <i>Punica Granatum</i>	
	Extrait aqueux	Extrait hydro-éthanolique	Extrait aqueux	Extrait hydro-éthanolique
Tanins	++	++	++	++
Flavonoïdes	+	+	+	+
Alcaloïdes : Mayer	+	+	-	+
Alcaloïdes : Dragendroff	-	+	-	+
Alcaloïdes : Wagner	-	+	-	+
Terpénoïdes	-	++	++	++
Saponines	++	-	++	-
Quinones liber	+	+	+	+
Anthraquinones	-	-	+	-
Sucre	++	++	++	++
Glycosides cardiaques	-	++	++	++

++: Composé fortement présent, +: composé présent, -: composé absent

- **Feuille d'*Olea europaea***

D'après les résultats de **tableau 12**, on constate que la plupart des composants présents dans l'extrait hydro-éthanolique : les tanins, terpénoïdes, sucres, et glycosides en forte quantité par contre les flavonoïdes, les alcaloïdes (dans tous les tests) et quinones liber présenté par une faible quantité. De plus observé l'absence des saponines et anthraquinones. Dans l'extrait aqueux nous remarquons la présence des tanins, flavonoïdes, alcaloïdes (test Mayer), saponines, quinones liber et des sucres. Mais il a été observé l'absence des alcaloïdes (test Dragendroff et Wagner), terpénoïdes, anthraquinones et glycosides.

Pour l'extrait aqueux: Une étude phytochimique sur les feuilles d'*Olea europaea* L. réalisé par **BELIMI & LAMOUDI (2021)** mis en évidence la présence des flavonoïdes et de tanins, les quinones libres, et les saponines. Avec l'absence des alcaloïdes, composés réducteurs, et les terpénoïdes. Nos résultats sont en accord avec les résultats mentionnés. Sauf, les composés réducteurs.

HIMOUR & al., (2016) ont réalisé un examen phytochimique qualitatif sur les feuilles de l'olivier, et ils ont observé la présence de flavonoïdes, de tanins, en quantité importante. Ils ont en outre révélé des quantités plus faibles de glycosides, de saponosides et de quinones et l'absence de terpénoïdes et d'alcaloïdes dans les extraits hydrométhanolique et hydroacétonique.

Un autre travail réalisé par **BRUNETON, (1999)** a élucidé la présence des flavonoïdes, tanins, saponosides, anthraquinones, ils sont signalés l'absence des alcaloïdes dans les feuilles.

Selon Dekdouk et ces collaborateurs en 2015, les tanins et les saponosides étaient présents en quantité plus importante dans les extraits de fruit de la plante d'*Olea europaea* L. (**DEKDOUK & al., 2015**).

- **L'écorce de *Punica Granatum***

Les tests de la composition réalisés sur les deux extraits relèvent la présence des tanins, les terpénoïdes, les sucres et les glycosides dans les deux extraits en quantité importante, et aussi les flavonoïdes et quinones liber mais à faible quantité. Par ailleurs, l'absence des alcaloïdes (tous les tests) dans l'extrait aqueux par contre leur présence dans l'extrait hydro-éthanolique (un peu quantité). En plus la présence des anthraquinones et saponines dans l'extrait aqueux et l'observation de leurs absences dans l'autre extrait.

Les résultats d'extrait hydro-alcoolique sont presque accord avec les résultats obtenu par **MOUALKIA & GOURMATI, (2015)**.

Les résultats des analyses qualitatives d'extrait aqueux sont partiellement en accord avec les résultats trouvés par **DOUAOURI, (2017)**.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Teneurs en phénols totaux

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre VU-visible, ont été utilisé pour l'évaluation de la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale. La macération et le solvant utilisé sont les principaux critères à prendre en considération pour une extraction rentable (**TURKMENE & al., 2007**).

La teneur en phénols totaux des deux extraits de feuille d'*Olea europea* et l'écorce de fruit de *Punica granatum* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique (**figure 13, Annexe A**). Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g E).

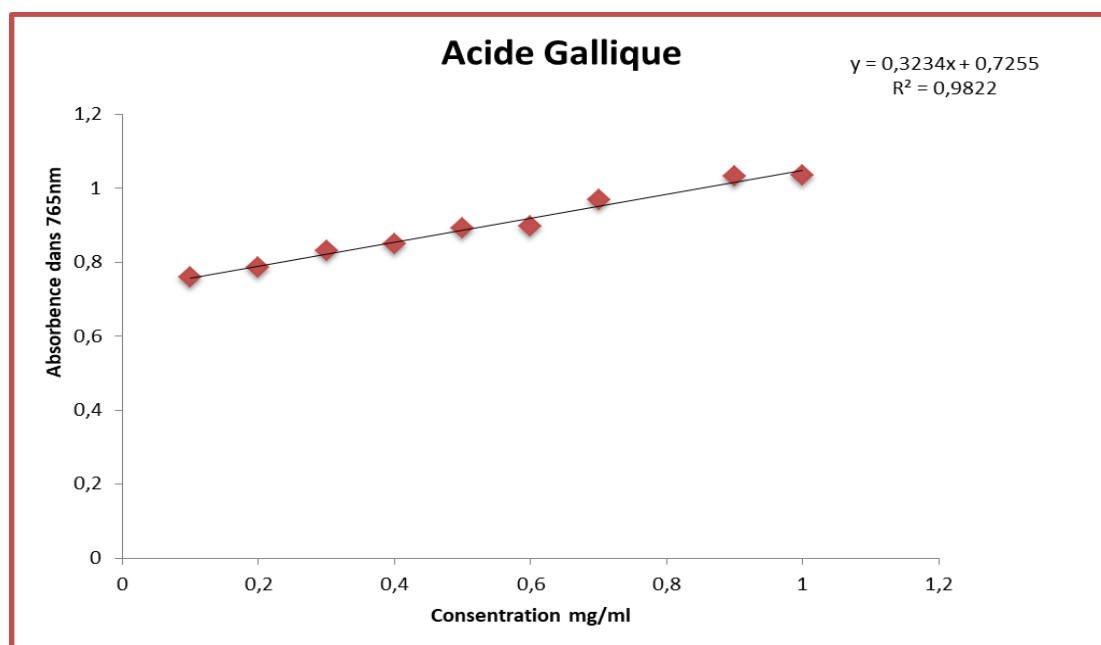


Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

- Feuilles d'*Olea europaea*

Les résultats de teneurs en polyphénols totaux des feuilles d'*Olea europaea* sont représentés dans la figure suivante :

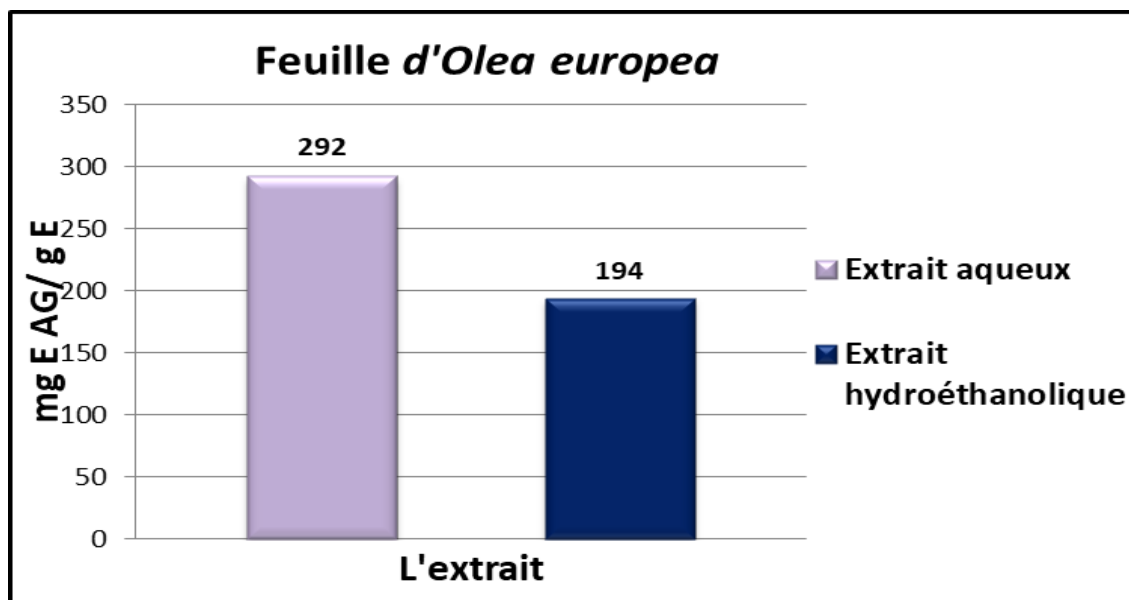


Figure 14: Teneurs en polyphénols totaux dans les feuilles d'*Olea europaea*

D'après les résultats qui sont mentionnées dans la **Figure 14**, on a trouvé que l'extrait aqueux possède la teneur élevée, avec une valeur de 292 mg EAG/g E par rapport l'extrait hydroéthanolique (192 mg EAG/g E). Nos résultats sont supérieurs aux résultats obtenus par l'étude de **KHALIQ & al (2015)**, dont ils ont travaillé sur l'extrait aqueux de deux autres variétés d'olive et ont trouvés que la teneur en polyphénols était comprise entre 109,6 et 161 mg/g. D'autre étude a été réalisée par **Azir (2017)**, dont la teneur était de (171.40 ± 6.79) mg EAG/g d'extrait) de l'extrait méthanolique des feuilles d'olive, ce résultat été inférieure à nos résultats.

Les feuilles d'olivier, sont considérées comme une source majeure de production de polyphénols par rapport aux autre parties de l'olivier, et en contiennent les teneurs les plus élevées (**RYAN & al, 2002**).

Cette variabilité est liée aux caractéristiques génotypiques de la variété de l'olivier, aux facteurs agro-climatiques, aux conditions culturales, aussi le solvant utilisée pour l'extraction (**BACCOURI & al, 2007**).

- **L'écorces de *Punica Granatum***

Le taux de polyphénols totaux existants dans les deux extraits est présenté dans la figure15.

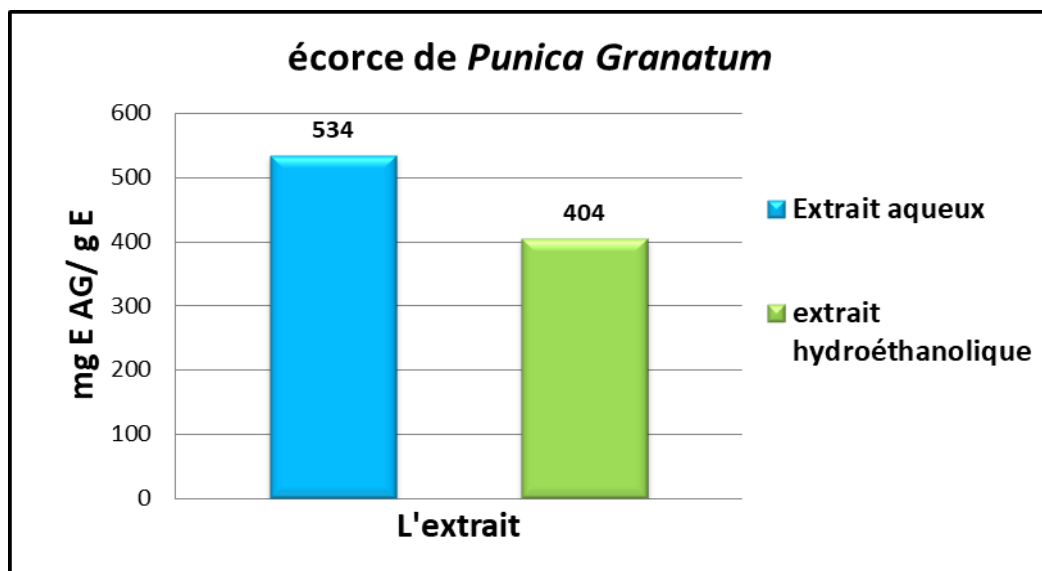


Figure 15: Teneurs en polyphénols totaux dans l'écorce de *Punica Granatum*

La teneur en polyphénols la plus importante a été enregistré pour l'extrait aqueux avec une valeur de 534 mg EAG/ g E alors que le contenu était minimum pour l'extrait hydroéthanolique (404 mg EAG/ g E).

Ces résultats sont presque similaires à ceux rapportés par **MOUALKIA & GOURMATI, (2015)** où une teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique $435 \pm 8,8$ mg EAG/g a été enregistrée.

Ils sont également plus élevés que ceux trouvés par **ZATOUM & GHANEM, (2017)** où une teneur en polyphénols dans l'extrait hydroéthanolique de l'ordre de $286,105 \pm 7,84$ mg EAG/ g extrait.

SALEH & al, (2017) ont récemment rapporté que la plus forte teneur en polyphénols était présente dans l'extrait aqueux avec une valeur de 810 ± 9.45 mg EAG/g.

Une autre étude faite sur plusieurs cultivars de grenadiers égyptiens a indiqué que les extraits aqueux et méthanolique de la variété Wardy contiennent le pourcentage le plus élevé en polyphénols totaux ($246,37 \pm 4,61$ et $214,91 \pm 3,29$) suivi par Assuity ($224,62 \pm 4,84$ et $190,44 \pm$

3,02); Nab El Gamal ($193,39 \pm 3,79$ et $148,13 \pm 2,99$) ; Manfalouty ($189,18 \pm 3,07$ et $163,70 \pm 3,47$) et Balady (179.30 ± 4.82 et 158.30 ± 4.15) mg GAE/g (ABDEL-HADY, 2013).

3.2. Teneurs en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La teneur en flavonoïdes contenus dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine à différentes concentrations (figure16, Annexe B). Les résultats sont exprimés en mg EQ/g E.

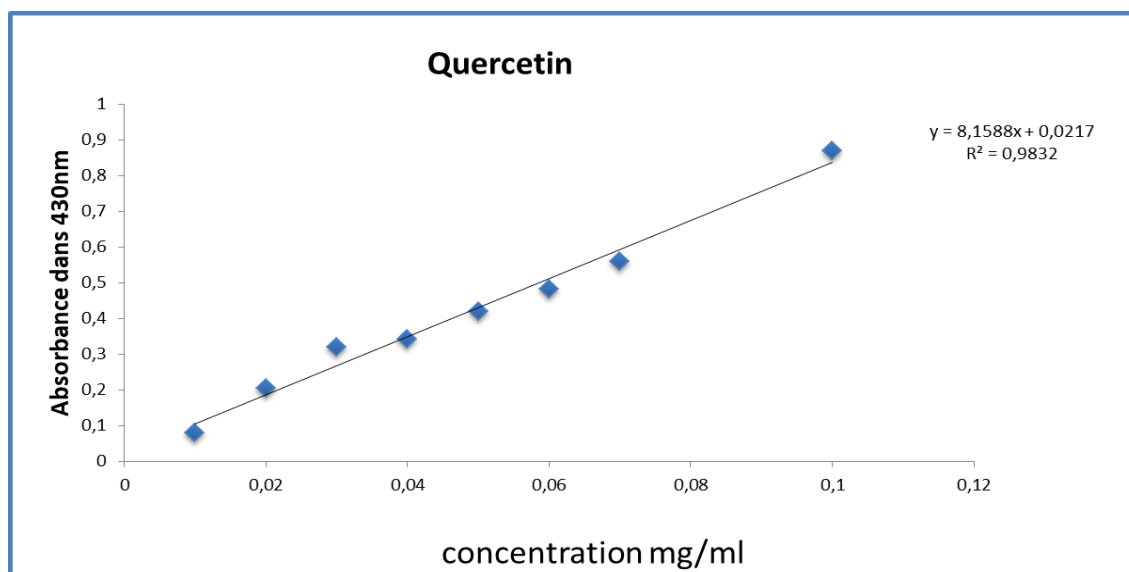


Figure16: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

- Feuilles d'*Olea europaea*

Les résultats de teneurs sont représentés dans la figure (17).

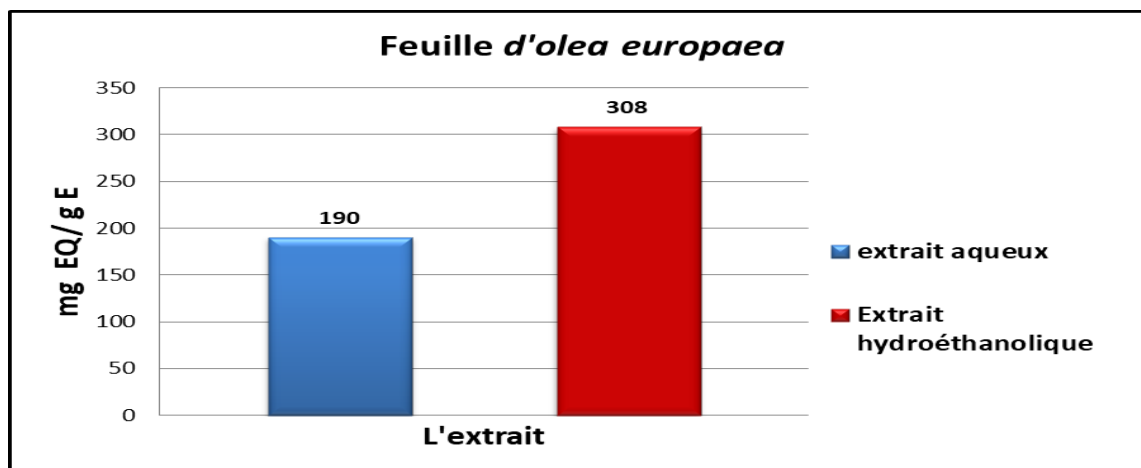


Figure17: Teneurs en flavonoïdes totaux dans feuilles d'*Olea europaea*

A partir de ces résultats (**figure 17**), on a remarqué que l'extrait hydroéthanolique riche en flavonoïdes (308 mg EQ/g E), par rapport l'extrait aqueux qui contient une valeur moins de teneur des flavonoïdes (190 mg EQ/g E). Les résultats obtenus par **OULDYEROU & al, (2018)** pour l'extrait méthanolique (894,33µg d'EQ/g) sont inférieurs que nos résultats. Un autre résultat obtenu par (**STANKOVI & al, 2017**) d'extrait de méthanol (98%) des feuilles d'*Olea europaea* collectées en différents régions (Tunisie, Malta, Montenegro, France, Serbia) a montré un contenu des flavonoïdes variaient entre 52,40 et 129,39 mg de Ru/g d'extrait.

Certains auteurs ont montré que la feuille d'olivier est caractérisée par sa richesse en composés bioactifs : les polyphénols totaux (**GRACIA & al, 2000**), flavonoïdes (**LEE & al, 2009**). La composition des feuilles d'oliviers en molécules bioactives change selon son origine, les conditions climatiques, le mode de séchage, le temps, les types de solvants d'extraction et les conditions de stockage (**ALTIOK, 2010**).

- **L'écorces de *Punica Granatum***

La **figure (18)** présente les résultats de contenant des flavonoïdes totaux dans les deux extraits des écorces de *Punica Granatum*.

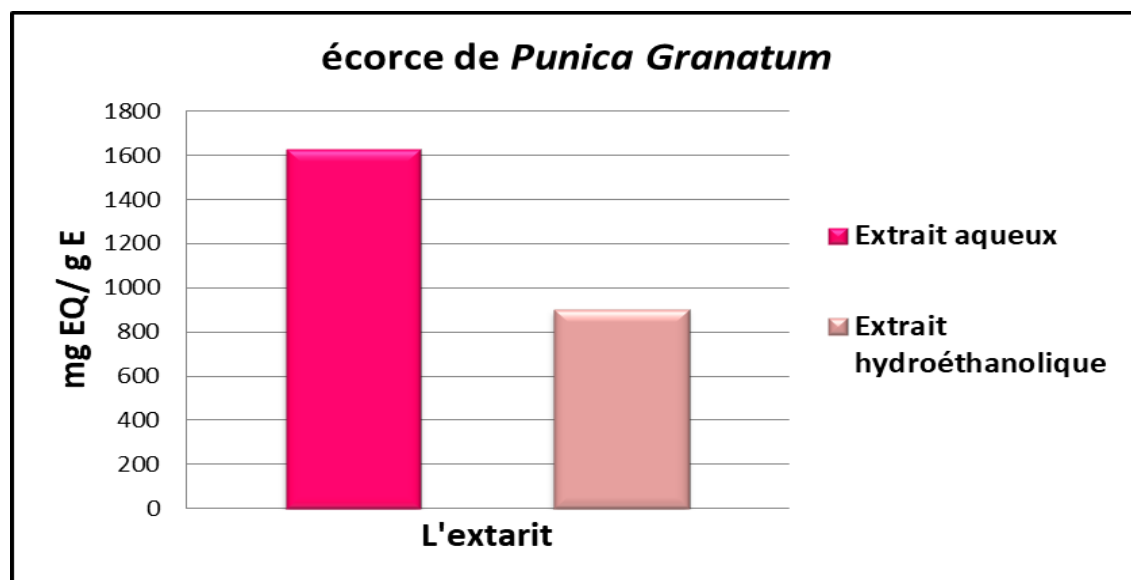


Figure 18: Teneurs en flavonoïdes totaux dans l'écorce de *Punica Granatum*

Les résultats représentées dans la **figure (18)** révèlent une richesse en flavonoïdes dans l'extrait aqueux par rapport à l'extrait hydro-alcoolique (éthanol/eau), Les concentrations sont de l'ordre de 1628mg EQ/g et 906 mg EQ/g respectivement.

Ces résultats est très élevé aux résultats obtenus par **SREEDEVI & al, (2017)**, qui ont trouvés des concentrations des flavonoïdes de 66.3 ± 1.25 mg EQ/g E et 77.26 ± 0.8 mg EQ/g E dans l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux respectivement.

Un autre résultat de l'extrait hydro-alcoolique ($588 \pm 5,96$ mg EQ/g E) obtenu par **BOURAOUI (2018)** est inférieur à notre résultat

3.3. Teneur des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de cette dernière à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré (**BOURAOUI, 2018**).

La catéchine a été utilisé comme étalon. Les résultats obtenus pour le dosage des tanins condensés (**figure 19, Annexe C**) sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g E) en utilisant l'équation de régression de la courbe d'étalonnage tracée pour la catéchine.

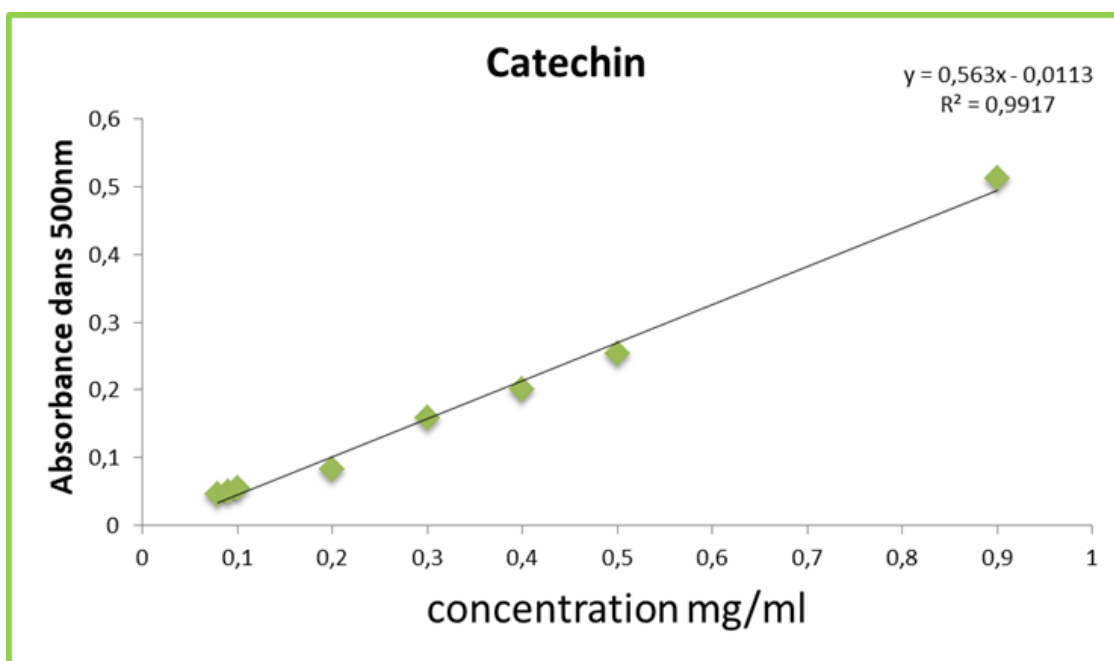


Figure 19: Courbe d'étalonnage de la catechin pour le dosage des tanins

- **Feuilles d'*Olea europaea***

Les taux de tanins condensé existants dans les extraits hydroéthanolique et (E h éthaOH) et l'extrait aqueux de l'écorce calculés sont présentés dans la (**figure 20**)

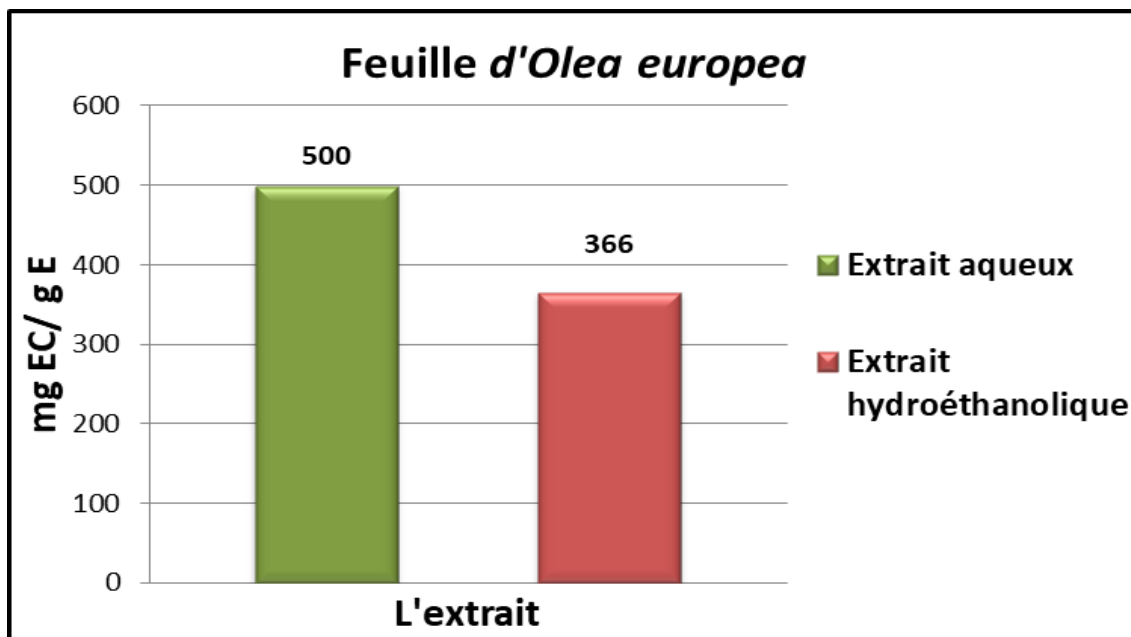


Figure 20: Teneurs en tanins condensés dans feuilles d'*Olea europea*

L'estimation quantitative de feuille d'*Olea europea*. A proposé la présence d'un teneur considérable en tanins condensés dans les deux extraits, mais dans l'extrait aqueux (500 mg EC/g E) est supérieur à l'extrait hydroéthanolique (366 mg EC/g E). Généralement les deux extraits riches en tanins.

Des résultats a été reçu par **BRAHMI & al, (2013)** pour la Variations des composés phénoliques et de l'activité antiradicalaire d'extraits de feuilles et de fruits d'*Olea europaea* collectés dans deux saisons indique que l'extrait méthanolique de deux type d'olivier contient un teneur en tanin entre 31.81 mg CEQ/100 g E-79.70 mg CEQ/100 g E. un autre résultats obtenu par **BEN MANSOUR-GUEDDES & al, (2020)**, l'extrait de feuilles a montré une différence significative entre les trois zones. L'extrait de feuilles récoltées au Sud et au Centre présentait de fortes teneurs en tanins condensés. En fait, le Sud ($0,84 \pm 0,00$ mg EQ/g E) et les feuilles centrales ($0,74 \pm 1,36$ mg EQ/ g E) ont enregistré le niveau le plus élevé en tanins condensés, mais ceux du Nord ($0,24 \pm 0,00$ mg EQ/g E) ont montré la quantité la plus faible.

- **L'écorces de *Punica Granatum***

Les résultats de teneur en tanin sont représentés dans la **figure (21)** :

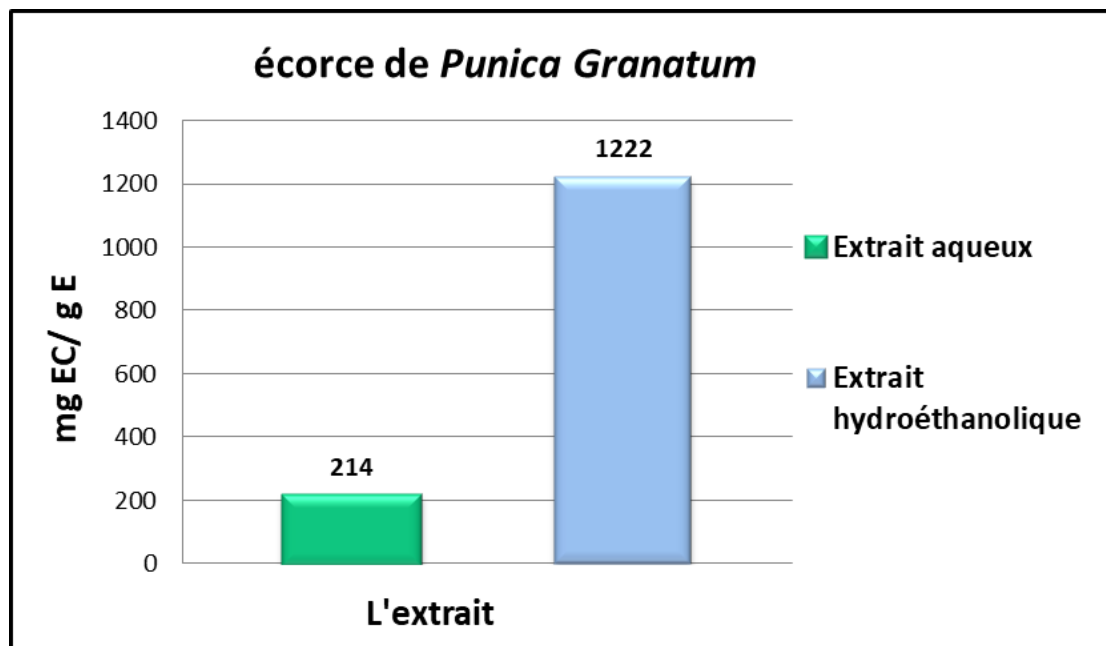


Figure 21: Teneurs en tanins condensés dans l'écorce de *Punica Granatum*

A partir des résultats observés dans la **figure (21)**, la teneur des tanins condensés dans l'extrait hydroéthanolique est plus élevée (1222 mg EC/g E) que trouvée dans l'extrait aqueux (214 mg EC/g E).

La quantité des tanins condensés dans l'écorce de la grenade étudiée (extrait hydroéthanolique) est supérieure à celle de **LEE & al, (2010)** qui ont trouvé par la méthode de dosage à la vanilline, 257.0 ± 19.6 mg équivalent de catéchine/g ES en utilisant l'acétone 70% pour l'extraction.

REGUIEG YSAAD & HAMMADI (2017) ont mesuré la teneur des tanins condensés de trois extraits de l'écorce de grenade (extrait aqueux, méthanolique et éthanolic) et ont obtenu des valeurs allant de 81,86 à 153 mg EAT/g Ps.

Une autre étude de **DOUAOURI (2017)** trouve que l'extrait méthanolique des écorces de grenade contient une quantité importante en tanin par rapport à l'aqueux (47.78 ± 3.27 mg EC/g E et 33.67 ± 0.86 mg EC/g E) respectivement.

En accord avec **ALTIOK & al, (2008)** ; **ABAZA & al, (2011)**, nous avons noté que l'incorporation du solvant organique à l'eau améliore la solubilité des différentes classes de composés phénoliques.

Après tous les résultats qualitative et quantitative généralement montent que les deux plantes riche en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins, mais avec une différence de valeurs entre les deux plantes.

Les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et en tanins varient qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs : Facteurs climatiques et environnementaux ...etc. (EBRAHIMI & al, 2008), Le patrimoine génétique, la période de la récolte (MILIAUSKAS & al, 2004), mais également le degré de maturation du plant et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (FIORUCCI, 2006), aussi le stade de développement de la plante (MILIAUSKAS & al, 2004), la méthode d'extraction (LEE *et al*, 2003) et solvant utilisée pour l'extraction (BACCOURI & al, 2007). La méthode de quantification peut également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes (LEE & al, 2003).

Aussi pour le teneur en tanins condensés ont augmenté avec la rigueur du climat, les courants d'air et les températures élevées BEN MANSOUR-GUEDDES & al, (2020).

4. Résultat d'isolement et d'identification des souches bactériennes

À partir de la solution mère de lait la chamelle et la première et deuxième dilution, nous obtenons après un nombre considéré de colonies (10), après la coloration de Gram, nous n'en choisissons que quatre. On symbolizer: SM 40 S2, D₂30 S1, D₂ 40 S2, D₁ 30 S2.

4.1. Aspect macroscopique

Après l'observation macroscopique des cultures sur gélose M17, on remarque que les colonies de petite et grande taille, blanche, crémeuse. Les bactéries apparaissent homogènes, ce qui indique leur pureté, à Gram positif.

4.2. Aspect microscopique

Dans notre recherche, l'observation microscopique a révélé que la forme majoritaire des cellules est la forme cocci ovoïde ou sphérique disposées par paires ou en chaînes.

Tableau 13: Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées

Souche	Coloration	Forme d'enchainement	Gram
SM 40 S2	Violet	Triplo-coque et diplo-coque	Positive
D ₂ 30 S1	Violet	Diplo-coque	Positive

D₂ 40 S2	Violet	Strepto-coque	Positive
D₁ 30 S2	Violet	Strepto-coque	Positive

4.3. Tests biochimique

Dans notre étude, nous avons fait une série de tests biochimiques que nous avons trouvés que Tous les échantillons sont pauvres des catalase, les bactéries lactiques sont généralement catalase(-) négative (MAMI, 2013), GUEDDA & BEN KHELIFA, (2017) ont fait la même expérience sur les bactéries lactique de lait de chamelle et ont obtenu le même résultat.

Notez que la croissance des SM 40 S2, D2 40 S2 et D2 30 S1 est élevée à 40 degrés en particulier SM 40 S2, contrairement au D1 30 S2 qui ont connu une croissance significative à une température de 10. Nous concluons que les trois premières souches sont thermophiles et la dernière est mésophile. Les résultats ont montré que les quatre souches se développent dans différents pH et différentes concentrations de NaCl.

Tableau 14: Résultats des tests Biochimiques

		Souches			
Tests		SM 40 S2	D1 30 S2	D2 30 S1	D2 40 S2
Catalase		-	-	-	-
T C°		++++	-	++	++++
Ph		+	+	+	+
NaCl		++	++	+	++
galerie API 10 s	ONPG	+	+	+	+
	GLU	+	+	+	+
	ARA	+	+	+	+
	<u>LDC</u>	+	-	+	+
	<u>ODC</u>	+	-	+	+
	<u>CIT</u>	+	-	+	+
	<u>H₂S</u>	+	-	+	+
	URE	+	-	+	+
	TDA	+	-	+	+

Dans le test de la galerie API 10s, le résultat des souches SM 40 S2, D2 30 S1 et D2 40 S2 était positif à l'exception du S2 D1 30 dans lequel nous avons trouvé 7 tests négatifs.



Figure 22: Les résultats de galeries API 10s (Photo originale, 2022)

Après ces tests, nous avons conclu que nos souches peuvent appartenir aux espèces suivantes :

- ✓ SM 40 S2: *Streptococcus thermophilus*
- ✓ D2 30 S1: *Pediococcus acidilactici*
- ✓ D1 30 S2: *Lactococcus lactis*
- ✓ D2 40 S2: *Streptococcus thermophilus*

4.4. Sélection des bactéries probiotiques

4.4.1. Tolérance à l'acidité

Le critère essentiel dans la sélection d'un microorganisme à potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre dans le tractus digestif et notamment aux pH acides et aux sels biliaries (KUSHARYATI & al, 2020)

Tableau 15: Effet du pH acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml)

souche \ pH	pH 2		pH 3		pH 4	
	t:0h	t:3h	t:0h	t:3h	t: 0h	t: 3h
<i>Lactococcus lactis</i>						
10 ⁻¹	1,845	1,903	1,845	1,699	2,342	2,929
10 ⁻²	2,845	2,477	2,778	3,000	3,415	3,477
10 ⁻³	3,477	3,000	3,845	3,477	1,230	4,491
Moyenne	2,722	2,460	2,823	2,725	2,329	3,633
<i>Pediococcus acidilactici</i>						
10 ⁻¹	2,447	2,079	2,462	1,845	1,845	2,519
10 ⁻²	3,255	3,176	2,903	2,301	3,230	2,602
10 ⁻³	3,903	3,778	3,954	3,778	4,079	3,301
Moyenne	3,202	3,011	3,107	2,641	3,052	2,807
<i>Streptococcus thermophilus</i>						
10 ⁻¹	2,041	2	2,301	2,398	2,255	2,623
10 ⁻²	2,477	3,041	2,602	3,079	2,903	3,398
10 ⁻³	3,954	3,699	4,255	4,255	3,699	3,954
Moyenne	2,824	2,913	3,053	3,244	2,952	3,325

À travers le **tableau (15)**, nous notons que la croissance de *Lactococcus lactis* a diminué après s'être incubé dans pH 2 et pH 3 à l'inverse dans pH 4 la croissance augmente et atteint la plus grande valeur. *Pediococcus acidilactici* diminue leur croissance dans toutes les valeurs de pH après l'incubation. La croissance de *Streptococcus thermophilus* est augmentée dans toutes les valeurs de pH après l'incubation et la valeur la plus élevée en pH 4 après l'incubation.

LINH & al, (2017) qui ont testé la tolérance de certaines souches probiotiques aux sucs gastriques intestinaux artificiels; ils ont constaté une diminution avec pH2 comparativement au pH 4.

4.4.2. Tolérance au sel biliaire

La résistance aux sels biliaires est l'un des critères importants pour la sélection des souches probiotiques, car l'intestin grêle et le côlon sont les premières niches de colonisation de l'organisme hôte par les souches probiotiques (**SALHI, 2020**).

Tableau 16: Effet des sels biliaires sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml)

	Concentration de bile %					
	1%		3%		5%	
	t:0h	t:3h	t:0h	t:3h	t:0h	t:3h
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1.308	1.452	0.125	1.014	0.523	0.727
<i>Lactococcus lactis</i>	0.970	0.824	1.091	0.222	1.247	1.067
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.079	1.239	1.222	0.824	1.286	1.125

À travers le **tableau (16)**, nous notons que lorsque la concentration de sel biliaire Compensé par une diminution de la croissance des bactéries après l'incubation donc il y a une sensibilité à sel biliaire.

Dans cette étude de (ZUO & al, 2015), toutes les souches isolées ont montré une sensibilité élevée aux sels biliaires, bien que généralement une sensibilité inférieure à celle rapportée dans une étude précédente d'ANDRIANTSOANIRINA & al(2013) où 24 souches ont montré une tolérance modérée (13 souches) ou faible (11 souches) à la bile. Cependant, les autres souches étaient intolérantes à la bile car il n'y avait pas de survie des bactéries après 5 h d'exposition à la bile. Les espèces *B. breve* et *B. adolescentis* présentaient le plus grand nombre de souches modérément tolérantes à la bile.

Les BSH sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. Un certain nombre de BSH ont été identifiés et caractérisés chez des bactéries probiotiques, la capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considérée comme critère de sélection des souches probiotiques (BESSIL & MESSAOUDI, 2021).

4.4.3. Pouvoir antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne est une propriété très importante dans la sélection des probiotiques, permettant ainsi la conservation des aliments et la prévention des infections gastro-intestinales (CHAMPOMIER-VERGES & al, 2010)

Tableau 17: Pouvoir antibactérienne des souches lactique

souches lactiques	souches pathogènes		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	14 mm	9 mm	14 mm
<i>Pediococcus acidilactici</i>	11 mm	7mm	12 mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14 mm	14 mm	18 mm

Grâce aux résultats, nous constatons que, Les bactéries lactiques sont résistantes aux bactéries pathogènes dans des proportions variables, et le plus résistante est *Streptococcus thermophilus*.

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide\bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (RAKHIS & LADJAL, 2016)

Ce résultat confirme celui obtenu par BOUGUERRA (2012) qui a trouvé que toutes les souches lactiques du lait de chamelle fermenté sont actives contre 5 bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* ATCC: 25922, *Bacillus subtilis* et *Enterobacter cloacae*).

DAVATI & al, (2015) ont déterminé que la plupart des souches lactiques isolées du lait de chamelle peuvent inhiber *S. aureus*, *B. cereus* et *E. coli*.

4.4.4. Sensibilité aux antibiotiques

Dans cette étude les bactéries lactiques à potentielles probiotiques provenant du lait de chamelle cru ont été analysées pour leurs sensibilité aux différents antibiotiques, en utilisant la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur boit de gélose. (KHARCHI & LEMCHOUNCHI, 2021)

Tableau 18: Résultats de test d'antibiotique. (I: intermédiaire, S: sensible, R: résistante)

Souches isolées / Antibiotiques	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
OX1	R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)
P10	R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)
OF5	S (31mm)	S (25mm)	S (35mm)

AT30	R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)
VA30	I (20mm)	R (6mm)	R (10mm)
E15	I (19mm)	S (21mm)	R (12mm)

Nous notons à travers le tableau que toutes les bactéries sont très résistantes à l'oxacilline, à l'azithronycine et à la pénicilline. *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus* sont sensible vers Ofloxacin. Et une résistance variable dans le reste des antibiotiques.

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de **TEMMERMAN & al, (2003)** ont montré que 68,4 des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus ((**RAKHIS & LAGDAL, 2016**).

Dans la plupart des cas, la résistance n'est pas transmissible, cependant il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genres. C'est une raison importante pour choisir les souches manquantes de transfert potentiel de résistance (**SAMEDI & CHARLES, 2019**). C'est-à-dire les gènes de résistance aux antibiotiques doivent être stables et ne doivent pas être transférés aux agents pathogènes de l'intestin grêle, car cela aurait un effet catastrophique sur la santé humaine (**MATIB & al, 2020**).

Après ces tests, on choisit la meilleure souche; elle est *Streptococcus thermophilus* parce que cela a montré les meilleures propriétés probiotique.

5. Etude de l'effet des extraits végétaux sur *Streptococcus thermophilus*

Après avoir choisi la bactérie *Streptococcus thermophilus*, nous effectuons les tests de résistance à sel biliaire et résistance à pH et test antibactérienne et test antibiogramme en présence de 4 extraits de plantes: extrait alcoolique de *Punica granatum L.*, extrait aqueux de *Punica granatum L.*, extrait alcoolique de feuilles d'*Olea europaea L.*, extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea L.* pour étudier leur impact sur l'amélioration des propriétés probiotiques de la souche choisie.

5.1. Résistance à la bile

Ce test nous permet de savoir à quel point *Streptococcus thermophilus* sont résistantes au sel biliaire en présence des extraits végétaux. Nous comparons la croissance de *Streptococcus thermophilus* en présence de chaque extrait avec la croissance avant utilisation l'extrait.

Tableau 19: Effet du sel biliaire acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence de 4 extraits

Extrait	1%		3%		5%	
	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h
aqueux de <i>Punica granatum L</i>	1.114	1.540	1.103	DN	0.824	1.523
alcoolique de <i>Punica granatum L</i>	0.921	1.114	0.523	1.437	0.368	ND
aqueux de feuilles d' <i>Olea europaea L</i>	1.523	1.222	1.301	1.496	1.426	DN
alcoolique de feuilles d' <i>Olea europaea L</i>	1.564	1.544	1.699	DN	ND	1.409

Le **tableau (19)** montré que, avant l'incubation:

- ❖ nous constatons que l'extrait aqueux de *Punica granatum L* a atteint la valeur la plus élevée de la croissance à la concentration 3% et 1%.
- ❖ la croissance avec l'extrait aqueux et alcoolique de feuilles d'*Olea europaea L* augmenté dans toute la concentration de sel biliaire.
- ❖ Au contraire, la croissance en présence d'extrait alcoolique de *Punica granatum L* est diminuée dans toutes les concentrations.

Après l'incubation:

- ❖ la croissance en présence de l'extrait aqueux de *Punica granatum L* et alcoolique de feuilles d'*Olea europaea L* augmente dans toutes les concentrations de sel biliaire.
- ❖ la croissance en présence de l'extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea L* et aqueux de *Punica granatum L* ont enregistré une légère diminution à la concentration 1% et une augmentation significative à la concentration 3% et 5%.

En fin de compte, nos résultats montrent qu'extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea* et alcoolique de *Punica granatum L* avaient de nombre plus élevés dans le nombre croissant de colonies.

5.2. La tolérance au pH

Nous avons testé la capacité de *Streptococcus thermophilus* à se développer à différents valeurs de pH en présence d'extraits, et comparé à leur croissance avant utilisation des extraits, nous montre à quel point ces plantes sont efficaces et leur contribution à l'amélioration de la capacité probiotique.

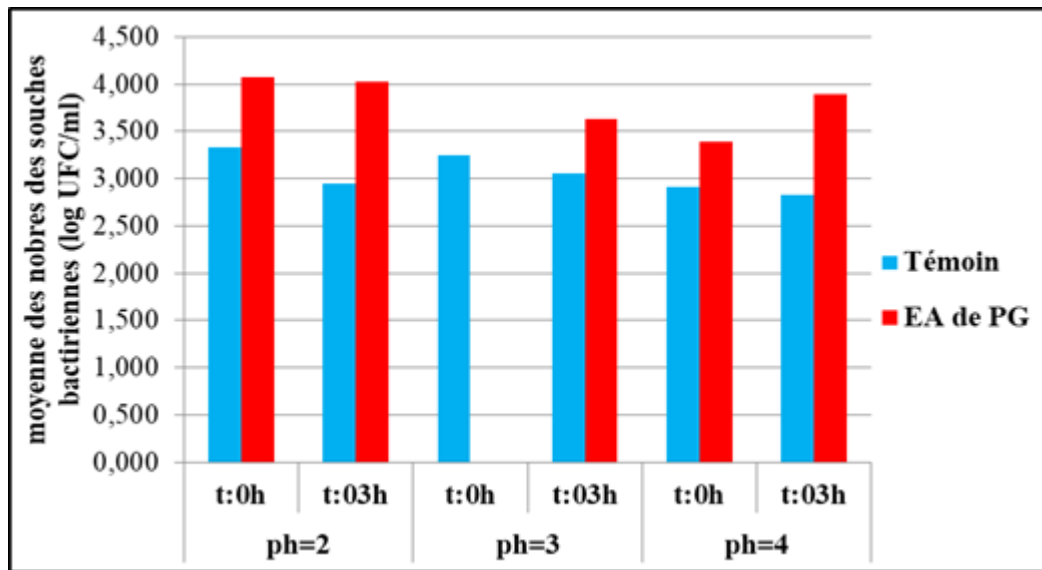


Figure 23: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait aqueux de PG

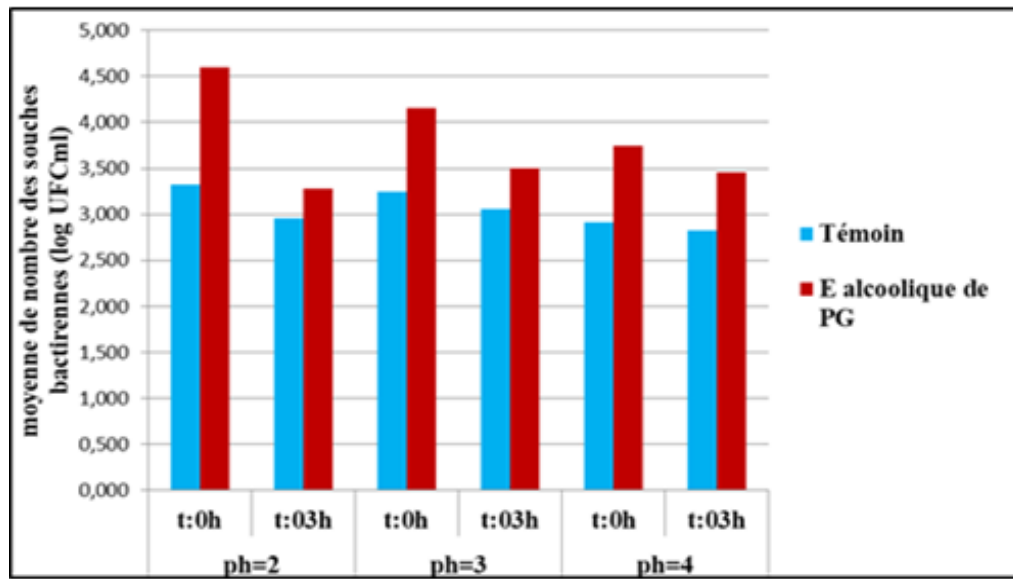


Figure 24: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait hydro alcoolique de PG

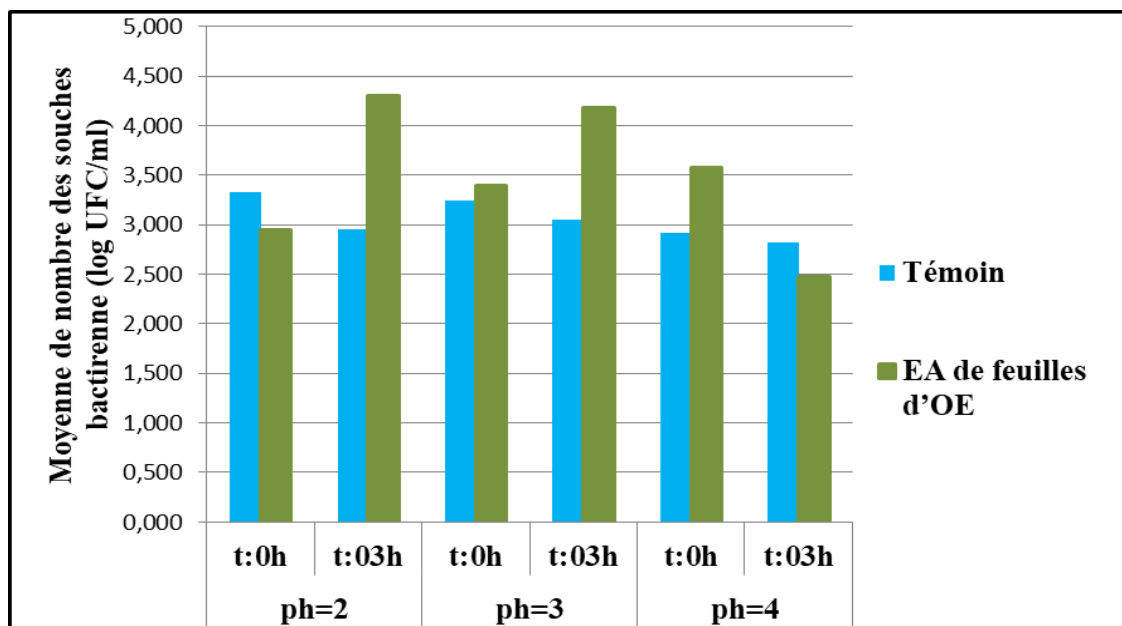


Figure 25: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait aqueux d'OE

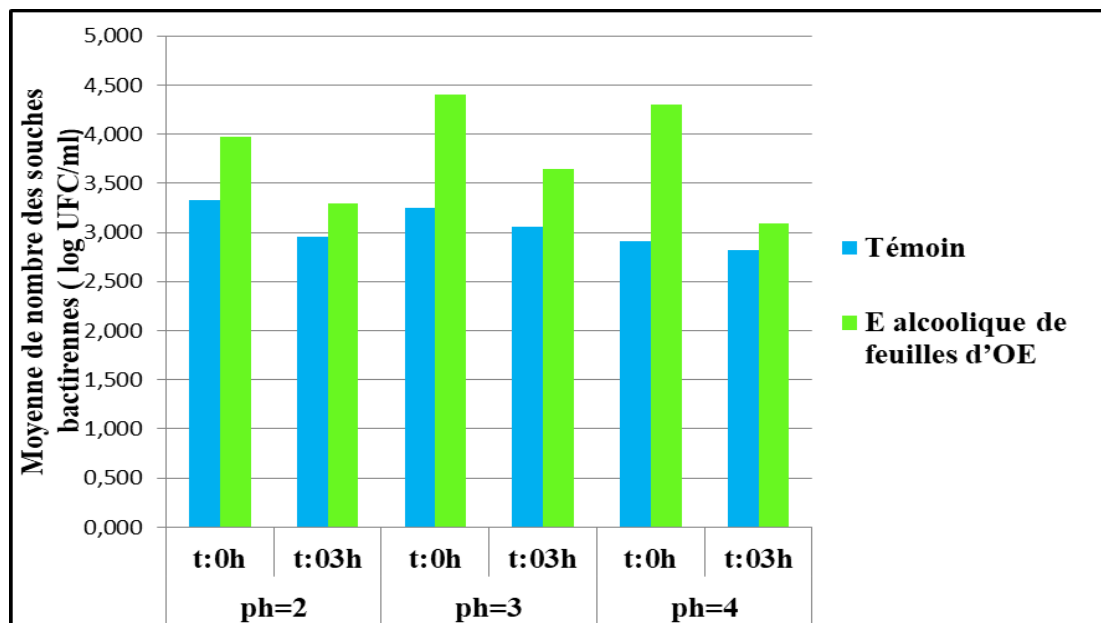


Figure 26: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait hydro alcoolique d'OE

Grace aux données (**figure 23, 24, 25, 26**), nous avons analysé les résultats et noté que:

- ❖ En pH 2 et après l'incubation monté que la croissance l'extrait alcoolique de *feuilles d'Olea europaea L* est le plus grand.
- ❖ En pH 3 et après l'incubation l'extrait aqueux de *Punica granatum L* est le plus efficace et, le résultat est non dénombrable des colonies.
- ❖ En pH 4, le plus grand nombre de colonies était en présence d'extrait alcoolique de *Punica granatum L*

En général, nous pouvons dire que tous les extraits ont affecté positivement pour la croissance de *Streptococcus thermophilus* de manière remarquable à différents valeurs de pH.

5.3. Test d'antimicrobienne

Dans ce test on étudie l'activité antibactérienne des extraits aqueux et alcooliques de feuilles d'*Olea europaea L* et *Punica granatum L* déterminée par la méthode de diffusion en gélose contre des bactéries pathogènes. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition des souches vis-à-vis de l'extrait selon l'échelle suivante décrite par **KONAN & al, (2014)** :

- Résistante : diamètre inférieur à 8mm.
- Sensible : diamètre compris entre 9 et 14 mm
- Très sensible : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20 mm

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 20: Diamètre de la zone d'inhibition des souches testées (en mm)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aqueux de feuilles d'<i>Olea europaea L</i>	14mm	6mm	9mm
Alcoolique de feuilles d'<i>Olea europaea L</i>	6mm	6mm	6mm
Aqueux de <i>Punica granatum L</i>	6mm	20	22
Alcoolique de <i>Punica granatum L</i>	25mm	12mm	20mm

À travers le **tableau (20)**, nous avons remarqué que:

- ❖ La résistance contre *Escherichia coli* est restée la même et a diminué contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en présence d'extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea L*.
- ❖ En présence l'extrait alcoolique de feuilles d'*Olea europaea L* *Streptococcus thermophilus* a enregistré un 'activité inhibiteur nulle.
- ❖ En présence l'extrait aqueux de *Punica granatum L* il n'y a pas une inhibition contre *Escherichia coli* au contraire *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* la *Streptococcus thermophilus* posséder contre eux une activation inhibitrice.
- ❖ En présence l'extrait alcoolique de *Punica granatum L* montré la plus grande zone d'inhibition contre toutes les bactéries pathogènes.

Selon **COWAN (1999)**, les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes.

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques sont de bon inhibiteurs des microorganismes pathogènes. Le mécanisme de l'effet antimicrobien des CP est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on cite : l'inhibition de la synthèse d'acides

nucléiques; l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique; l'inhibition du métabolisme énergétique microbien et l'inhibition des enzymes hydrolytiques. (YAKHLEF, 2019).

Selon KING & YOUNG (1999), l'extrait aqueux de *Punica granatum* a un effet antimicrobien sur les microorganismes. Cette activité antimicrobienne est due à la présence des polyphénols. Les extraits phénoliques des écorces de grenade ont stimulé la prolifération de la flore lactique.

PRASHANTH & al, (2001) ont étudié, in vitro, l'action de différents extraits d'écorce de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les extraits d'écorce de grenade employés sont obtenus à partir de solvants différents, permettant d'isoler les divers principes actifs de ce fruit. Ainsi, en utilisant comme solvant l'eau à température ambiante. Il y aura isolement des tanins et d'autres composés phénoliques, tandis qu'avec le méthanol, des tanins et des alcaloïdes sont extraits. Toutefois, le chloroforme permet d'extraire les alcaloïdes et enfin avec l'éther de pétrole, des stérols. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis*.

REGUIEG (2019) qui montré les extraits de grenade présentent une activité antimicrobienne significative contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*. Les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *S. aureus* et *E. coli*. REGUIEG (2019) a résumé les mécanismes d'effet antimicrobien des polyphénols

- ✓ Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe, peut impliquer multiples modes d'actions. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :
- ✓ L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens .
- ✓ La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer .
- ✓ L'inhibition de métabolisme microbien
- ✓ Dégradation de la paroi cellulaire microbienne

- ✓ Perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite de composants cellulaires .
- ✓ L'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN, des protéines, des lipides et la fonction mitochondriale. Exemple, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase
- ✓ Formation des complexes avec la paroi.

Dans ce test l'extrait de feuille d'olive n'a pas affecté *Streptococcus thermophilus* pour inhibé les souches pathogènes, contrairement à l'étude d'**KHAFAILAH & BOUGUERB (2021)** qui ont montré que une sensibilité modérée est notée chez *S. aureus* PTCC 1431, *E. coli* PTCC 1399 et *B. cereus* PTCC1274 avec des zones de 9mm ,8.5 mm et 9.5 mm successivement a concentration de 50 mg/ml d'extrait et une résistance est notée chez toutes les souches testées avec les autres concentrations d'extrait des feuilles d'olivier (10, 15, 25 et 35 mg/ml).

5.4. Test antibiotique

Les résultats de ce test sont présentés dans les histogrammes et le tableau montre les diamètres obtenus avec chaque antibiotique et chaque extrait. Après l'application des recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologies (2007) (**MAMI, 2013**).

R: résistante <17mm

I: intermédiaire 18mm-20mm

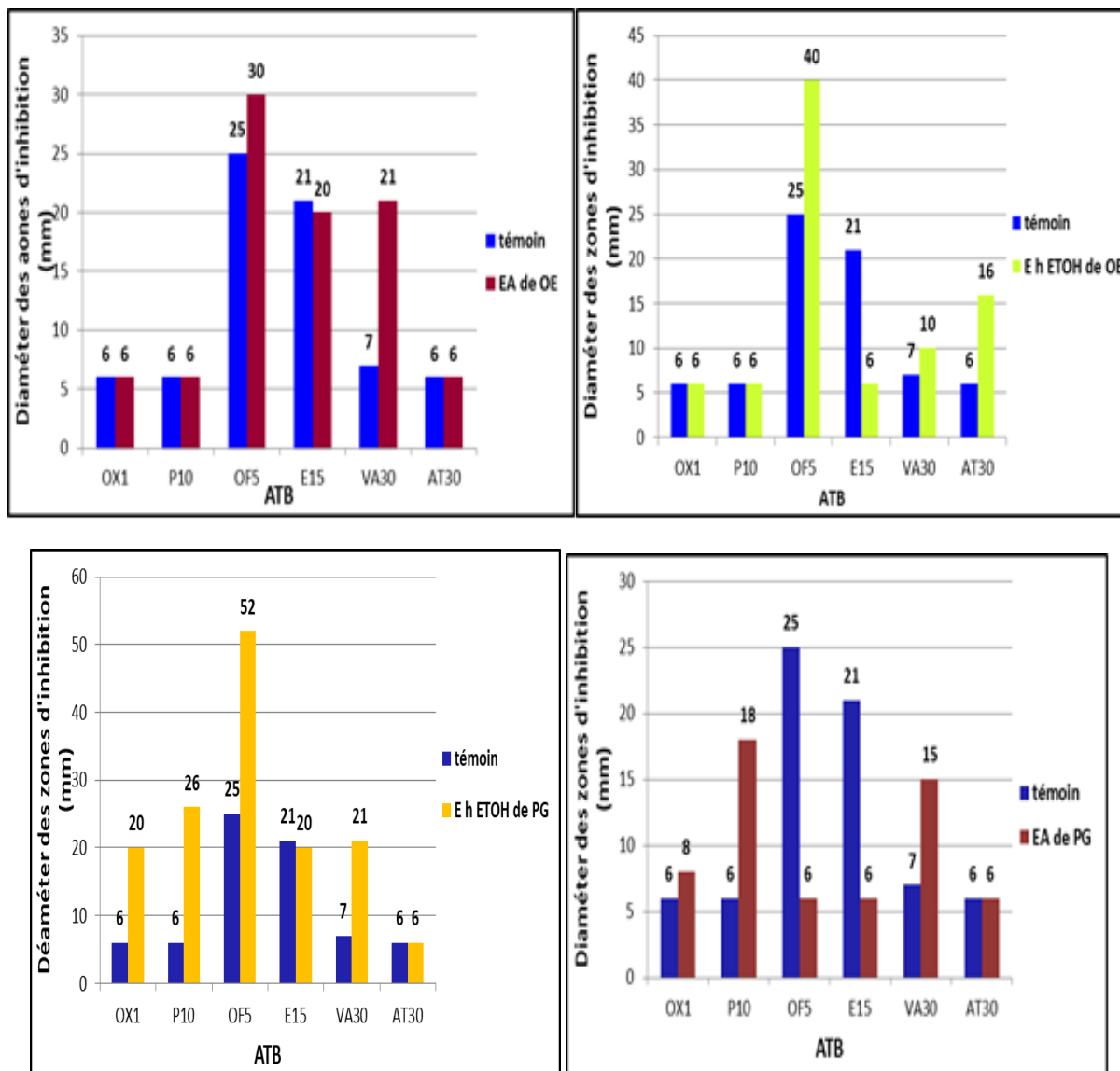


Figure 27: Histogrammes d’effet des extraits végétaux sur les antibiotiques

Grâce aux histogrammes (**figure 27**), nous notons que:

- ❖ En présence extrait aqueux de *Punica granatum L* la bactérie *Streptococcus thermophilus* est résisté à Oxacilline et Ofloxacine et Vancomycine et Azithromycine mais sensible à Erythromycine et intermédiaire à Pénicilline.
- ❖ En présence extrait alcoolique de *Punica granatum* les bactéries n’ont résisté à aucun des antibiotiques seulement étaient moyennement résistantes à Oxacilline et Erythromycine. Il a également montré une sensibilité à Ofloxacine et Azithromycine et Vancomycine et Pénicilline.

- ❖ En présence extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea* L Le bactérie n'ont résisté qu'aux antibiotiques sauf Oxacilline.
- ❖ En présence extrait alcoolique de feuilles d'*Olea europaea* L *Streptococcus thermophilus* est résisté aux Erythromycine et Azithromycine et Vancomycine mais est sensible aux Oxacilline et Ofloxacin et Pénicilline.

Les 4 extraits favorisent la résistance aux antibiotiques, ceci est susceptible d'augmenter le nombre des bactéries plus en présence de polyphénol de *Punica granatum* L et feuilles d'*Olea europaea* L. **AIT SAID & HAMEG (2019)** ont étudié l'effet d'extrait d'écorce de grenade (prébiotique) sur la des bifidobactéries et résultats révèlent que le nombre de colonies des bifidobactéries bactéries est plus important en présence du gel d'extrait d'écorce de grenade. Cela démontre que le gel d'extrait d'écorce de grenade stimule la croissance des bifidobactéries.

HADDADIN (2010) a montré que les extraits de feuille d'olivier pourraient bien jouer un rôle bénéfique dans la promotion des bactéries probiotique.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVE

Conclusion

La nature est une source de richesses inestimables pour l'homme car elle lui permet de subvenir à ses besoins alimentaires mais aussi de se soigner.

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine (médecine traditionnelle), pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient du fait que les plantes médicinales sont un réservoir de composé naturels aux effets bénéfiques, c'est-à-dire riche en substances bioactives.

Ce travail avait pour objectif d'étude l'effet d'un extrait (extrait aqueux et extrait hydro-alcoolique) végétal (feuilles d'*Olea europaea* et l'écorces de *Punica granatum* sur les bactéries probiotique.

Nos investigations phytochimiques ont porté sur deux extraits : aqueux, et hydroéthanolique des parties aériennes de l'espèce d'*Olea europaea* L et l'écorces de *Punica granatum*. Il consiste à quantifier les métabolites secondaires dans les extraits afin d'élargir et approfondir la connaissance phytochimique de cette plante pour des études biologiques.

La préparation des extraits à partir les deux plants a montré que l'extrait hydroéthanolique de l'écorce de *Punica granatum* contient le rendement plus élevé (41%).

Le criblage phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des tanins, flavonoïdes, quinones libre et les sucres dans les deux plantes et les deux extraits. Mais Les alcaloïdes, terpénoïdes, anthraquinones, saponines, et les glycosides cardiaque leurs présences dans des extrait et absence dans l'autre extraits

L'analyse quantitative des extraits dès les deux plantes a révélé que l'extraits aqueux de d'*Olea europaea* et *Punica granatum* riche en polyphénols que l'extrait hydro-alcoolique (292 mg EAG/ g E, 535 mg EAG/ g E) respectivement. L'extrait hydroéthanolique d'olivier et l'extrait aqueux de grenadier contient une quantité importante de flavonoïdes (308 mg EQ/ g E, et 1628 mg EQ/ g E respectivement), et pour les tanins l'extrait aqueux des feuilles d'olivier et l'extrait hydro-alcoolique des écorces de grenadier sont plus riche que les autre extrait 500 mg EC/ g E et 1222 mg EC/ g E respectivement.

Ces résultats quantitatifs montrés que l'écorce de *Punica granatum* plus riche en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, et tanins) que les feuilles d'*Olea europaea*.

Enfin, dans ce travail on a évalué l'effet de ces extraits sur l'activité de la bactérie *Streptococcus thermophilus*.

Les souches bactériennes sont isolées à partir du lait de chamelle. Il est riche en les bactéries probiotiques (*Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus*) qui ont un rôle dans la préservation du système digestive. L'identification et sélection des probiotiques à partir des tests physico-chimique et test galerie Api 10s.

Les probiotique sont résister différents valeurs de ph, sel biliaire et ont un pouvoir antibactérienne et résistent les antibiotiques.

Les résultats de cette étude ont montré que les écorces du grenadier qui contient une quantité notable de polyphénols, flavonoïdes, et de tanins peuvent jouer un rôle majeur dans l'activité de la bactérie probiotique (*Streptococcus thermophilus*) surtout en particulier dans l'inhibition des bactéries pathogènes, et aussi sans oublier les feuilles d'olivier qui contiennent une quantité importante des composés phénoliques. A partir de quelle nous assurons que les deux affectent positivement le système digestif.

Perspective

Les probiotiques et les prébiotiques sont encore à un stade précoce d'utilisation et surtout à l'échelle industrielle, suite aux résultats de notre étude il serait intéressant de réaliser les points suivants :

- Etude l'effet de *Punica granatum L* et feuilles d'*Olea europaea* à les probiotique in vivo.
- Etude l'effet de polyphénol à les enzymes des bactéries lactique.
- Etude la valeur nutritionnelle de l'ajoute le polyphénol sur le lait et ses dérivés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

Référence bibliographique



1. **Ababsa, A. (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Memoire pour l'obtention du diplôme de de Magister. Option : Génie Microbiologique, Université Ferhat Abbas. Setif, 1–111.
2. **Abaza, B. L., Youssef, N. Ben, Manai, H., & Haddada, F. M. (2011).** Chétoui olive leaf extracts : influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Test*, 62(1), 96–104.
3. **Abdelali, Z & Bouhali, I. (2021).** Taxonomie numérique et étude phylogénétique des bactéries isolées de lait cru de vache. mémoire de master en Spécialité Microbiologie appliquée. Université Larbi Ben Mhidi. Oum ElBouaghi. pp10
4. **Abdel-Hady, N.M. (2013).** Quantitative diversity of phenolic content in peels of some selected Egyptian pomegranate cultivars correlated to antioxidant and anticancer effects. *Journal of Applied Sciences Research*, vol 9, no 8, pp. 4823-4830
5. **Achouche, M & Azouzi, A. (2019).** Evaluation in vitro du pouvoir hypoglycémiant des extraits des feuilles de *Punica Granatum L.* Mémoire de mastère en spécialité : Physiologie Cellulaire Et Physiopathologie. Université Djilali Bounaama, Khemis-Miliana. Pp : 05-08
6. **Adour, K & Dabouz, S. (2016).** Evaluation des aptitudes probiotique lactobacilles isolé du beurre et du L'ben. mémoire de master en Spécialité Microbiologie Alimentaire et santé . Université A. MIRA. Bejaia. pp 03.
7. **Ait Said, C & Hameg, M. (2021).** L'effet de l'ajout de l'extrait d'écorce de grenade (prébiotique) sur la viabilité des bifidobactéries (probiotiques) dans le yaourt. mémoire de mastère en agro-alimentaire et contrôle de qualité. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. Pp: 02
8. **Al-Hijna, O.S.A & Bouriche, H. (2017).** Grenade de Beni Snous : Etude et Caractérisation Chimique des Extraits de Pépins, Evaluation de l'Activité Microbiologique. Diplôme de Docteur en Pharmacie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid Faculté de Médecine Tlemcen. Pp : 08-11

9. **Aliouche, N & Chekired, I. (2019).** Performances probiotiques de *Lactobacillus plantarum* S10 lors de la digestion bucco-gastro-intestinale en présence de deux matrices végétales. Mémoire de mastère en microbiologie appliquée. Université Mohammed Seddik Ben Yahia, Jijel. Pp: 01
10. **Altıok, E.(2010).** Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and antioxidant characteristics) from local plants.
11. **Altıok,E., & Ulku,S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves bay absorption an silk fibron
12. **Amandine, F. (2017).** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Thèse doctorat. Université de La Réunion.pp 23.
13. **Amari, N.O. (2015).** Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité antifongique de *Thymelaea hirsuta* (Cas des dermatophytes). Thèse docteur en sciences Agronomiques. Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem. Pp : 37-39
14. **Amrouche, T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat, University Laval, Canada.
15. **Andriantsoanirina, V., Allano, S., Butel, M. & Aires, J. (2013).** Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe* , Volume 21 , p. 39e42.
16. **Argenson, C., Régis, S., Jourdian, J. M., & Vaysse, P. (1999).** L'olivier. 22, rue Bergère 75009 Paris : pp. 08-19.
17. **Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., CoccaignBousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447
18. **Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e

Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

19. **Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D., Zhou, W., Zheng, X. (2016).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 17(8), 597–609.
20. **Azir, H . (2017).** Evaluation de l'activité antioxydant des extraits des feuilles *d'olea europaea* sativa (olivier). thèse de magister, Université Mohammed khider, PP 5 -30

B

21. **Baccouri, B., Zarrouk, W., Krichene, D., Nouairi, I., Ben Youssef, N., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2007).** Influence of fruit ripening and Crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected Oleasters (*Olea europaea* L.). *J. Agro* 6 (3): pp. 388-396.
22. **Bahri, D. (2016).** Isolement de la flore lactique à partir d'un lait de vache destiné à la fabrication du camembert . Memoire de mastère en Biologie. Universite Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. pp 12.
23. **Bayou, S., & Kerroum, A. (2020).** Le grenadier (*Punica Granatum*) : Usage traditionnel, étude phytochimique et évolutions thérapeutiques récentes. Mémoire de mastère en chimie pharmaceutique. Université Mohammed seddik ben Yahia, Jijel. Pp : 06-20
24. **Bechachha, K., Boudershem, R., Marai, R. (2020).** Les Bactéries lactiques : Rôles et Intérêts. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en Spécialité qualité des produits et sécurité alimentaire. Université 8 Mai 1945. Guelma. pp 03.
25. **Belaidouni, N. W. (2017).** *Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes*. Memoire de mastère en Biologie . Universite Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. pp 1.
26. **Beldjilali,R & Touahria N,H. (2021).** Les biosurfactants des bactéries lactiques. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en biologie. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi. B.B.A.pp 03.
27. **Belhadj, Z. (2020).** Exploration de l'activité anti-bactérienne de certaines souches

probiotiques isolées à partir du poisson. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. 5-6.

28. **Ben Mansour-Gueddes, S., Saidana-Naija, D., Bchir, A., & Braham, M. (2020).** Climate change effects on phytochemical compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(1), 436–455.
<https://doi.org/10.15835/NBHA48111615>
29. **Benaissa, I & Zaidi, F. (2021).** Etude de l'activité antifongique d'extrait d'olivier *Olea europaea* contre *Aspergillus niger*. Mémoire de mastère en Sciences Agronomiques. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, B.B.A. pp : 03
30. **Ben-Arie, R., Segal, N., & Guelfat-Reich, S. (1984).** The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109(6), 898-902.
31. **Bencheikh, D. (2017).** Hypoglycemic medicinal plants used in Setif region and their effects on experimentally-induced diabetes in rats. Thesis Doctorate of Sciences Biology, Special: biochemistry. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Pp: 47.
32. **Benhayoun, G., & Lazzeri, Y. (2007).** L'olivier en Méditerranée : du symbole à l'économie. Editions Le Harmattan. Paris, - p137. PP17
33. **Benine, CH. (2020).** Contribution to the phytochemical study of *Cynodon dactylon* L. harvested from El Oued region. Memoir of master in biological science. El-Chahid Hamma Lakhdar University El- Oued. Pp: 28
34. **Benkherbache, Z. R., & Benkherbache, A. (2021).** *Punica granatum* L. un arbre historique, évolutions thérapeutique récentes et activités biologiques. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie. Université Mohamed Boudiaf - M'SILA. Pp : 11-32
35. **Benlagha, R., & Khelil, Y. (2019).** Evaluation de l'activité antioxydant des extraits aqueux obtenus par trois méthodes d'extractions à partir des feuilles d'*Olea europaea*. Mémoire de mastère spécialité biochimie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra. Pp: 03-04.
36. **Benmessaoud, A. (2019).** Recherche de l'effet inhibiteur des extraits des feuilles d'*Olea europea* sur l'activité de l'alpha amylase in vitro. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie appliquée. université de Tlemcen. Pp : 26.

37. **Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012).** Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174.
38. **Berradia, A. (2016).** Isolement, purification et identification des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. 23p.
39. **Bessila, R. & Messaoudi, L. (2021).** Propriétés probiotiques des bactéries lactiques. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie. Université de Larbi Tebessi. Tébessa. pp17.
40. **Bessila, R. & Messaoudi, L. (2021).** Propriétés probiotiques des bactéries lactiques. Mémoire de master. Université de Larbi Tebessi-Tébessa.
41. **Bodinier, M. (2019).** The value of prebiotics and probiotics in allergen immunotherapy. *Revue Française d'Allergologie*, 59 (3), 113–114. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2019.02.009>.
42. **Boizot N & Charpentier J-P., (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier Technique de l'INRA. N° Special, 79-82
43. **Bouaziz, M., Grayer, R.J., Simmonds, M.S., Damak, M., & Sayadi, S. (2005).** Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53,; 236-241
44. **Boubendir, F & Titi, S. (2021).** Etude de l'activité biologique des métabolites secondaires d'une plante médicinale : *Olea europaea* L. mémoire pour l'obtention diplôme de Master en Chimie. Université Muhammad Al-Seddik Benyahia, Jijel. Pp: 04
45. **Bougaddima Y. Sebaha Z. (2019).** Isolement et identification des bactéries lactiques à statut probiotique à partir de *Sardina pilchardus*. Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem .
46. **Bougandoura, N., Bendimrad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoïques de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L) Briq. *Revue « Nature & Technologie » B-Sciences Agronomiques et biologiques*, 9. Pp : 14-19.
47. **Bouguerra, A. (2021).** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées

à partir du lait de chamelle. Thèse doctorat Microbiologie. Université Ferhat Abbas, Sétif
1. Pp: 01

48. **Bouguerra, A.(2012).** Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle. Thème Magister en microbiologie. Université Ferhat Abbas -SETIF.
49. **Boukhalfi, F.(2020).** Contribution à l'évaluation de quelques caractères probiotiques et technologique de Bifidobactéries isolées à partir des selles de nourissons et lait maternel.Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra.
50. **Boulos, L. (1983).** Medicinal plants of north africa. Reference Publication : Algonac, MI. Pp : 109-175.
51. **Boumediene, K. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Memoirevde Magister en Biologie Université Abou Bekr Belkaïd. Tlemcen. pp 03.
52. **Boumelta, A & Benfridja, N. (2021).** Survie et activité antioxydante de souches probiotiques dans un système simulé au tube digestif. Mémoire mastère en microbiologie appliquée. Université Mohammed Seddik Ben Yahia, Jijel. Pp: 01
53. **Bourgou, S., Serairi, B.R., Medini, F. & Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbiahelioscopia. Journal of new sciences 32. Pp : 1649-1655
54. **Brahmi, F., Beligh, M., Madiha, D., & Mohamed, H. (2013).** Variations in Phenolic Compounds and Antiradical Scavenging Activity of Olea Europaea Leaves and Fruits Extracts Collected in Two Different Seasons . Industrial Crops and Products 49 (août): 256 64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.042>
55. **Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., & Hammami, M. (2012).** The efficacy of phenolic compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*. 38: P. 146-152.
56. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 3ème Édition. Médicinales internationales Technique et Documentation. Paris. P.1-50
57. **Bruneton, J.(2009).** Pharmacognosie Phytochimie des Plantes médicinales. 4ème Edition. Lavoisier, Paris. P. 117-119

58. **Butel, M.J. (2015).** Bifidobacterium. <https://www.emconsulte.com/article/968548/bifidobacterium>.

C

59. **Calin Sanchez, A., & Carboneli Banaching Angel, A. (2005).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine antioxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural antioxydant granatum+ et Université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne. Pp: 77
60. **Calvez, S., Belguesmia, Y., & Kergourley, G. (2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.
61. **Carmona, B. (2017).** Thèse doctorat .Probiotique (Bactéries Et Levures) : Ou en est-on Aujourd'hui ?. Université de MONTPELLIER UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.
62. **Carrion, Y., Ntinou, M., & Badal, E. (2010).** Olea europaea L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. Quaternary Science Reviews 29.p: 952–968
63. **Chahnez, S. (2013).** Effet de l'Irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes & cytoprotectrices de l'écorce de Punica granatum. Mémoire pour l'obtention diplôme de mastère en Sécurité Sanitaire Des Aliments. Université de Carthage. Pp :23-25
64. **Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Fadda, S. (2010).** Proteomics: A Tool for Understanding Lactic Acid Bacteria Adaptation to Stressful Environments. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (eds.). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, USA. pp. 57-72.
65. **Cherrad, Z. & Tazegouaret, I. (2020).** Isolement, identification et diversité génétique par les marqueurs moléculaires des bactéries lactiques qui présentent l'activité protéolytique isolées du lait de Chèvre. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Larbi Ben M'hidi Oum el-Bouaghi.
66. **Collins, J. (2020).** Prebiotics. <https://www.webmd.com/digestive-disorders/prebiotics->

overview

67. **Corrieu, G., Luquet, F. M. (2008).** Bactéries lactiques : de la génétique au ferment. Paris: Edition Tec et Doc Lavoisier p, 153 ; p. 849.
68. **Cowan, MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microb. Rev. Vol. 12: 564-582.
69. **Curtay, J.P. Jacob, L. Jung, R.R. & Kaplan, M. (2008).** Jus de grenade fermenté, la grenade, “aliment-plus” un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l’arsenal de la nutrithérapie. Macro pietteur (EDS), Paris, 73p.

D

70. **Da Silva, S. (2013).** Conséquences d’un stress chronique sur la barrière de mucus intestinal chez le rat : effet du probiotique *Lactobacillus farciminis*. Thèse doctorat. Université de Toulouse. Pp:30
71. **Davati, N., Yazdi, F. T., Zibae, S., Shahidi, F., Edalatian, M. R. (2015).** Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(5), 1–6.
72. **De Almeida, J. (2015).** Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. Food Control, 53, 96–103.
73. **De Leonardis, A., A. Acetini, G. Alfano, V. Macciola & G. Ranalli. (2008).** Isolation of a hydroxytyrosol rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. Eur. Food Res. Technol., 226: 653-659
74. **Debji, B., Harish, G., Pragati Kumar, B., Duraivel, S., Aravind, G., & Sampath Kumar, K.P. (2013).** Utilisations médicinales de *Punicagranatum* et ses bénéfices sur la santé. Journal of pharmacognosy and Phytochemistry, Volume 1 Issue 5, ISSN: 2278-4136.
75. **Dekdouk, N , Malafrente, N ,Russo, D, Faraone, I , De Tommasi, N, Ameddah, ,Severino, L, & Hindawi, L.M .(2015).** Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 684925, 9 pages.
76. **Diaz, A., Rallo, P., & De la Rosa, R. (2006).** Self- and cross-incompatibility

mechanism: a strategy to ensure high variability in olive populations. *Olea*, 25: 29-35.

77. **Diouf, P.N., Stevanovic, T. & Boutin, Y. (2009)**. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 297-303
78. **Djelloul.Daouadji,S.(2021)**. Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes. These en Microbiologie Moléculaire et Protéomies. Université Djillali Liabes de SIDI BEL ABBES.
79. **Djenane, D., Yanguela, J., Derriche, F., Bouarab, L., & Roncales, P. (2012)**. Extrait de feuilles d'olivier; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*: 10-18
80. **Douaouri, N.H. (2018)**. Contribution à une étude phyto thérapeutique, anti inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo, thèse doctorat, Université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem. Pp: 40-41.
81. **Dridier, DJ & Prevost, H. (2009)**. Bactéries lactiques : Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles, édition economica, France, 99 p.

E

82. **Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., & Yousefadi, M., (2008)**. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. 110(4) p 927-931.
83. **ELMeddah, Z & Ladjal, Ch. (2017)**. Etude de l'activité antibactérienne de souches lactiques isolées du lait de vache. Mémoire de master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. pp 06.
84. **Essma, G., (2019)**. Modélisation mathématique de quelques activités à intérêt technologique chez des souches de bactéries lactiques isolées de lait fermenté "l'ben" algérien. Thèse de Doctorat. Université Ahmed Ben Bella. Oran. 195 Pages.

F

85. **Fabbri, A., & Benelli, C. (2000).** Flower bud induction and differentiation in olive. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 75: 131-141
86. **Farag, R.S., Mahmoud, A., & Basuny, A.M. (2007).** Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 107-115
87. **Fellah, H., Kesouri, R., Chaieb, K. Karray Bouraoui, N., Trablesi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte rendue biologique*, 331:372-379
88. **Fiorucci, S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat, université de Nice-Sophia Antipolis, Nice (France). p.211.
89. **Fooks, L. and G. Gibson (2002).** "Probiotics as modulators of the gut flora." *British journal of nutrition*88(S1): s39-s49

G

90. **Garcia, OB., Castillo, J., Lorente, J., & Ortuno, A. (2000).** Del-Rio, JA Activité antioxydante de composés phénoliques extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. *FoodChem.* 68. pp: 457– 462.
91. **Garnier, G., Bezanger-Beauquesne, L., & Debranx, G., (1961).** Ressources médicinales de la flore française.
92. **Gaussorgues, R. (2009).** L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique?. *Revue française d'allergologie* 49:S2–S6.
93. **Ghedira, K. (2008).** L'Olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89
94. **Goy, D., Jakob, E., & Haldemann, J. (2015).** Les fermentations lactiques. Département fédérale de l'économie de la formation et de la recherche (DEFR) *Agroscope*.59. pp 06.
95. **Guedda, Z. Ben khelifa ,(2017).** L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir de différents types de lait. Mémoire de Master en biochimie. Université Echahid Hamma Lakhdar-ELOUAD .
96. **Güney, D., & Güngörmüşler, M. (2021).** Development and Comparative Evaluation of

a Novel Fermented Juice Mixture with Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 495-505.

H

97. **Haddad, M., Nasri, O., Mansouri, A. (2020).** Effet d'extrait d'écorce de la grenade sur les bactéries lactiques: Synthèse bibliographique. mémoire de master en biologie. Université 8 Mai 1945. Guelma. pp23.
98. **Haddadin, M. S. Y. (2010).** Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), 787–793. <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.787.793>
99. **Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., & Riechel, T.L. (1998).** High molecular weight plant polyphenolics (tanins) as antioxidants. *Journal of Agric. Food Chem*, 46:1887-1892
100. **Hammes, W. P. and R. F. Vogel (1995).** The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria, Springer: 19-54 .
101. **Haroune, N & Ouatmani, S. (2016).** Les Probiotiques et les prébiotiques. Mémoire de mastère en sciences alimentaires. Université Abderrahmane Mira, Bejaia. Pp: 01
102. **Hassaine, O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, thèse de doctorat. Université d'Oran Esenia, 180p
103. **Himour S. (2006).** Etude comparée de régénération de plants par voie végétative en culture in vitro. Mémoire de Magister en en biologie et physiologie végétale, Univ. Mentouri, Constantine. p : 92
104. **Himour, S., Yahia, A., Belattar, H. et Bellebcir, L. (2016).** Etude phytochimique des feuilles d'*Olea europaea* L. var Chemlel d'Algérie. *Journal of Bioresources Valorization*, 1(1), 34.
105. **Hmid, I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum* L) : caractérisations physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais, thèse, Université d'Angers France. Pp : 20-22

106. **Hogg, T. (2005)**. Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

J

107. **Joffin, J.N. & Leyral, G.(1996)**. Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France. 219-223.

108. **Jones, W.P., Kinghorn, A.D. (2005)**. Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker, S. D., Latif, Z & Gray, A.I. Natural Products isolation. Humana Press (Totowa). Pp : 323-411.

K

109. **Kabeerdoss, J., R. S. Devi, et al. (2011)**. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers." *Nutr J*10: 138.

110. **Kaneria, M., Kanani, B., & Chanda, S. (2012)**. Assessment of effect of hydroalcoholic and decoction methods on extraction of antioxidants from selected Indian medicinal plants. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), 195-202.

111. **Karumi, Y; Onyeyili, P.A; Ogugb uaja, V.O. (2004)**. Identification of active principales of balsamina (Balsam apple) leaf extract. *J. Med. Scien.* 4: 179-182.

112. **Kechaou, N. (2012)**. Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes. 192 p.

113. **Khafallah, N.& Bouguerba, N. (2021)**. Activités antimicrobiennes des extrais des feuilles d'Oliver. Mémoire de Master. Microbiologie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra.

114. **Khaliq, A., Sabir, S. M., Ahmad, S. D., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Jabbar A., Qamar., & Khan, A. (2015)**. Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88:pp. 16 – 21

115. **Khaliq, A., Sabir, S. M., Ahmad, S. D., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Jabbar A., Khan, M., Panchal, S., & Vyas, N. (2007)**. *Olea europaea* L. *Phytopharmacol Rev.* 1(1) P.114 -118.

116. **Khoddami, A., Wilkes, M.A., & Roberts, T.H. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18. Pp 2328-2375
117. **Khoumeri, L. (2009).** Influence de la photopériode, des milieux de culture et des hormones de croissance sur le développement in-vitro des embryons et des micro-boutures de l'olivier (*Olea europaea L.*) Var. Chemlal. Thèse. Ing. P:100
118. **King, A ., & Young, G. (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *The American Dietetic Association*. 99: 213-218.
119. **Klaenhammer, T. R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *FEMS microbiology reviews*12(1): 39-85.
120. **Komaki, E., Yamaguchi, S., Marui, Kinoshita, M., Kakehi, K. Ohta Y., & Tsakada, Y. (2003).** Identification of Anti-Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Science. Technology. Research.*, 9(1): 35-39.
121. **Konan F.K., Guessennd N.K., Oussou K.R., Coulibaly B.A., Djaman A.J., Dosso M. (2014).** Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi (EBLSE). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8(3) : 1192-1201.
122. **Krieg, N.R. (2001).** the Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria-identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. Williams and Wilkins, Baltimore., 721. pp 33.
123. **Kusharyati, D. & al. (2020).** Bifidobacterium from infant stool: the diversity and potential screening. *BIODIVERSITAS*, 21(6), pp. 2506-2513

L

124. **Laffargue, C. (2015).** Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine. These d'exercice pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier
125. **Land, M. H., K. & Rouster-Stevens. (2005).** Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*115(1): 178-181.

126. **Latreche, B.(2016)**. Caractérisation des bactéries lactiques isolées du beurre cru, évaluation de leurs aptitudes technologiques et leur utilisation dans la fabrication de la crème sure. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université Des Freres Mentouri Constantine.
127. **Lee, C.J,Chen, L.G,Liang,W.L.Y & Wanga, C.C. (2010)**. Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118: 315–322.
128. **Lee, J., & Watson, R.R. (1998)**. Pomegranate: a role in health promotion and AIDS. *Nutrients and Foods in AIDS*179,CRC Press, Boca Raton, FL, vol 192, p. 179-192
129. **Lee, J., Koo, N., et Min, D. B. (2009)**. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safty*. 3: Pp : 21-33.
130. **Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003)**. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and redwine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25): P: 7292-7295.
131. **Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S & Kim, Y. C. (2009)**. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource technology*, 100 (23): 6107-6113.
132. **Lewington, A., & Parker, E. (1999)**. Ancient trees. Trees that live for a thousand for a Thousand Years (National Trust History & Heritage),Sterling, first edition , New work, 224p
133. **Loussert, R & Brousse, G. (1978)** .L'olivier .Ed. Maisonneuve et Larose, Paris. Pp : 447.

M

134. **Maghnia D., (2011)**. Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens. Mémoire de magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran-Es-Senia.pp 27.
135. **Mahmoudi, F. (2014)**. Thèse Doctorat. Les substances antimicrobiennes produites par les Bifidobactérium et leurs effets sur les bactéries entéropathogène.

136. **Majob F., Kamalinejab, M., Ghaderi N., & Vahidipour, H.R., (2003).** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 77-82.
137. **Makhloufi, K. ,(2011).** caractérisation d'une bactériocine produite par une bactéries lactique *Leuconostoc pseudom* :esenteroides isolée du bosa. Thèse présenté pour le grade de Docteur en Spécialité : Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie.P5,19,86.
138. **Mami, A.(2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spescetre d'action vis-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaire en Algeries. Thèse de Doctorat. Microbiologie appliquée. Universit Ahmed Ben Bella-Oran.
139. **Marston, A. & Hostettmann, K. (2006).** Separation and quantification of flavonoids. In: Andersen, O'.M. and Markham, K.R., Eds. Flavonoids: Chemistry, Biochemis try and Applications, CRC Press-Taylor and Francis Group, Boca Raton. Pp: 1-36.
140. **Marteau, P. & Seksik, P.(2005).** Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. Thèse de Doctorat. France. Lab. 73-76.
141. **Matib, L et al.(2020).** Propriétés probiotiques des bactéries lactiques du lait maternel et de la flore intestinale des nourrissons. Mémoire de Master. Microbiologie Appliquée. Universitaire Mohammed El-seddik-Djijel.
142. **Mayouf, N. (2015).** Propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et immun modulatrice des extraits d'*Asphodelus microcarpus*. Thèse doctorat en Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif 1. Pp : 40
143. **Medda, A. (2010).** Les mycorhizes de l'olivier (*Olea europea L.*) Aspect écologiques, effet sur la croissance et exploitation en pépinière. Thèse Doct. en biologie végétale. Univ Badji Mokhtar, Annaba. 116p.Mediterranean". Agriculture and Human Values; 20:87 95.méditerranéenne. Ed.G.P. Maisoneuve ET larose. 437p.
144. **Metzidakis, I. T. (1997)** .Proceedings of the third international symposium on Olive growing: Acta Horticulture, Crete, Chania & Greece. 1(474)
145. **Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of somemedicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry, 85(2),

231-237.

146. **Minelli, S., Maggini, F., Gelati, M.T., Angiolillo, A., & P.G. Cionini. (2000).** The chromosome complement of *Olea europaea L.*: characterization by differential staining other chromatin and in situ hybridization of highly repeated DNA sequences. *Chrom Res.* 8:615-619.
147. **Minist, P., Scientifique, R., Appliqu, M., Alimentaires, S., Fili, M., Option, S. B.** Thème Isolement et sélection de souches de bactéries lactiques à effet probiotique.
148. **Mirad, F., & Badis. (2019).** Activité antioxydant et antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier sauvages et cultivés, thèse de magister, Université Akli Mohand Ohandoulhaj, Bouira, PP : 22-23.
149. **Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain marine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.
150. **Morzouglal, D., & Rabouh, K. (2019).** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'olivier. Mémoire pour l'obtention du diplôme de mastère Agronomie Spécialité: Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire. Université Ziane Achour –Djelfa. Pp: 03.
151. **Moslehi-Jenabian S, Pedersen L, Jespersen L. (2010).** Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients.* 2(4):449-473.
152. **Moualkia, H & Gourmati, M.(2015).** Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti- inflammatoire de plantes *Punica granatum L* et *Lawsonia inermis*. mémoire de mastère en Biologie et Physiologie Végétale . Université des frères Mentouri, Constantine. pp: 86-106
153. **Mureşan, A., Sârbu, I., Pelinescu, D., Ionescu, R., Csutak, O., Stoica, I., & Vassu-Dimov, T. (2017).** In vitro selection of some lactic acid bacteria strains with probiotic potential. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(4) ,1-14

N

154. **Nacri, I. (2016).** Etude phytochimique et activités biologiques de *Diplotaxis* sp.:

Application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques. Thèse doctorat en chimie. Université de Sfax. Pp : 42

155. **Naïmi, S. (2014)**. Isolement , caractérisation et étude in vitro de l ' activité anti-inflammatoire de différentes souches probiotiques.
156. **Nefzaoui, A. (1995)**. Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March
157. **Nicolas.A.(2021)**.Les probiotiques naturels et l'équilibre intestinal. <https://www.nicolas-aubineau.com/probiotiques-naturels/> .
158. **Noémie, B. (2016)**. Le microbiote intestinal, les probiotiques et leur place dans les pathologies digestives basses du nourrisson. Thèse pour le diplôme docteur en pharmacie. Université de Limoges. Pp: 02

O

159. **Oloyede, O.I. (2005)**. Chemical Profile of Unripe Pulp of Carica papaya. Pakistan journal of nutrition. 4: 379-381.
160. **Otmani, Y., & Slimani, M. (2018)**. Activité antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits des feuilles d'olivier (*Olea europea L.*) et du lentisque (*Pistacia lentiscus L.*). Mémoire Master, université de Tizi ousou, P69.
161. **Ouldyeou k., Righi S., Meddah B., Tir touil A. , Bouhadi D., H. A. (2018)**. Eude phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes antidiabétique au niveau de la wilaya de mascara. Journal of Advanced Research in Science and Technology, 5(1), 670–679.
162. **Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2004)**. Antimicrobial components from lactic acid bacteria." FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-139: 375-396.

P

163. **Pagnol, J. (1975)**. L'olivier .4 édition, 18p
164. **Paper, F. A. O. F. (n.d.)**. Probiotics in food FOOD AND NUTRITION.

165. **Pilet, M.F., Magras C., Federigh M., (2005).** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
166. **Pintado, M.M., Gomes, A.M., Freitas, A.C. (2014).** Probiotics and Their Therapeutic Role. In: Sousae Silva, J., P., Freitas, A.C. Probiotic bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects., CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 47-94.
167. **Piquepaille, C. (2013).** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse pour le diplôme docteur en pharmacie. Université de Limoges. Pp: 14
168. **Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.
169. **Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., (2001).** Antibacterial activity of Punica granatum. Fitoterapia. N°72. Pages 171-173.
170. **Pyar, H., Liong, M-T., & Peh, K. K., (2013).** "Recent advances in probiotics and biomedical applications." The Journal of Medical Sciences.13(8): 601-614.

Q

171. **QA international collectif. (1996).** L'encyclopédie visuelle des aliments .livre. Quebec Amerique (EDS), Singapour. Pp: 685
172. **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., & Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. Journal of Ethnopharmacology, 72(1-2), 35–42.
173. **Quy-Diem, D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis, 22(3), 296–302.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>

R

174. **Rakhis, S. Ladjal, H.(2016)**. Etude de quelques propriétés probiotiques des quelques souches Lactobacillus isolées de lait chamelle et de chèvre. Mémoire de master. Nutrition et Santé. UNIVERSITE ABDEL HAMID IBN BADIS-Mostaganem.
175. **Reguieg Yssaad, A & Hammadi, K. (2017)**. In Vitro Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*). American Journal of Microbiology and Biotechnology, 4 (6), 100-107
176. **Reguieg Yssaad, A. (2019)**. L'effet de punica granatum sur la flore gastrique ; étude in vitro et in vivo chez le rat. Thèse Doctorat. Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem.
177. **Ren, D. & al., (2014)**. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine. Anaerobe, Volume 30, pp. 1-10.
178. **Rodrigues, U. M., Aguirre, M., Facklam, R. R., & Collins, M. D. (1991)**. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol.*71: 509-516.
179. **Roselli, M., A. Finamore, et al. (2006)**. Probiotic bacteria Bifidobacterium animalis MB5 and Lactobacillus rhamnosus GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic Escherichia coli K88." British journal of nutrition95(06): 1177-1184.
180. **Rossoni, R.D., de Camargo Ribeiro, F., de Barros, P.P., Mylonakis, E., & Junqueira, J.C. (2020)**. A Prerequisite for Health: Probiotics. Microbiomics, 225–244.
181. **Rugini, E. (1998)**. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.).*Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14(3)207-214.
182. **Ruis, A. R., (2015)**. Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine. *Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, vol: 15, n:1. Pp: 22-33
183. **Ryan, D., Antolovich, M., Hert, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., & Robartds, K. (2002)**. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *J. Agric Food Chem.* 23: P. 6716-672.

184. **Saad, D. (2009)**. Etude des endomycorhizes de la variété sigoise d'olivier (*Olea europea L.*) et essai de leur application a des boutures semi-ligneuses, Mémoire de magister, université d'Oran, P 98
185. **Sahraoui, K & Habara, N. (2019)**. Evaluation de l'Activité Antidiabétique des Extraits Aqueux obtenus par trois Méthodes d'extraction à Partir Des feuilles d'*Olea europea*. Mémoire de mastère spécialité biochimie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra. Pp : 04.
186. **Saleh, H., Golian, A., Kermanshahi, H., & Mirakzehi, M.T. (2017)**. Effects of dietary α -tocopherol acetate, pomegranate peel, and pomegranate peel extract on phenolic content, fatty acid composition, and meat quality of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, vol 45, no 1, p. 629-636.
187. **Salhi, H. & Souaker, A.(2020)**. Isolation of lactic acid bacteria strains via goat and camel raw milk and evaluation of their probiotic effects.Mémoire de Maste en Biochimie Appliquée. Universite Echahid Hamma Lakhdar-ELOUAD .
188. **Salminen, S. Wreight, AV & Ouweh , A. (2004)**. Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
189. **Samuelsson, G. (1951)**. Facteur abaissant la pression artérielle dans les feuilles d'*Olea europaea*. *Farmaceutisk Revy*, 15. P : 229-239.
190. **Scognamiglio, M., Abrosca, B., Pacifico, S., Fiumano, V., De Lucab, P.F, Monaco, M.,& Fiorentino, A. (2012)**. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). *Food Research International* 46 (1), 294-303.
191. **Seidel, V. (2005)**. Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker, S.D, Latif, Z & Gray, A I. Eds. Humana Press (Totowa). Pp: 27-37.
192. **Servin, A. L. & M.-H. Coconnier. (2003)**. "Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*17(5): 741-754
193. **Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., & Singh, A. (2014)**. Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9 (1–2), 17–22.

194. **Sitzia, G. (2009).** La Grenade, une bombe de jeunesse. SKY.H.202120 Prebiotic Foods To Support Digestive Health. <https://www.trifectanutrition.com/blog/prebiotic-foods-to-support-digestive-health> .
195. **Spacova, I., Dodiya, H. B., Happel, A.-U., Strain, C., Vandenheuvel, D., Wang, X., & Reid, G. (2020).** Future of probiotics and prebiotics and the implications for early career researchers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1400
196. **Stanković, M., Ćurčić, S., Zlatić, N., & Bojović, B. (2017).** Ecological variability of the phenolic compounds of *Olea europaea* L. leaves from natural habitats and cultivated conditions. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 499–504.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1275804>
197. **Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M, Voordeckers, K., & Verstrepen, K.(2014).** Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *Fems Microbiology Reviews*. 38(5):947-99
198. **Stiles, M.E.,& Holzapfel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : pp 02.

T

199. **Tahlaiti, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Thèse doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. 24-25.
200. **TalhAaoui, N., Taamalli, A., Gomez-Caravaca A. M., Fernandes, G., Utiérrez, A., & Segura Carretero, A. (2015).** Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*.77. p : 92–108
201. **Temmerman R.,Pot B.,Huys G and Swings J (2003).** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int.J.Food Microbiol.*81 :1-10
202. **Thompson, J., Gentry-Weeks C.R., (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*, Vol. I, p 239-290.
203. **Thomson, A., Andres, J., Argentine, D. P., Irlande, F. S., Ellen, M., & Etats, S. (2011).** Probiotiques et Prébiotiques. 1–23.

204. **Tourte, Y., Bordonean, M. (2005).** Le monde des végétales : organisations, physiologie et génomique. Eds. Dunod. Paris. France. PP 25-26
205. **Tuck, K.L. & P.J. Hayball. (2002).** Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 636-644.
206. **Tuhin K. B., Nandini P., Srikanta P., Shrabana C., Saheli B., Tapan S., (2016).** Evaluation of *Cynodon dactylon* for wound healing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 197, p. 128-137
207. **Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F et Polat, G (2007).** effet of extraction conditions on measured total polyphénol contents and antioxydant and antibacterial activites of black tea .*molecules* , (12):484-496

V

208. **Vanderpool, C., F. Yan, & al. (2008).** Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* 14 (11): 1585-1596.
209. **Visioli, F. & C. Galli, (2000).** Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42, 209-221.
210. **Vissers, M.N., P.L. Zock, A.J. Roodenburg, R. Leenen & M.B. Katan, (2002).** Olive oil phenols are absorbed in human. *J. Nutr.*, 132, 409-417.

W

211. **Wald Elodie. (2009).** Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Thèse doctorat. Université Henri Poincare. 158p
212. **Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H. (2003).** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472.

Y

213. **Yadav, R. & Shukla, P. (2017).** Probiotics for Human Health: Current Progress and

Applications. In: Shukla, P. (ed.), Recent Advances in Applied Microbiology. Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp.133–147.

214. **Yakhlef, W. (2019)**. Caractérisation des profils phénoliques et évaluation de l'activité antibactérienne du contenu phénolique des margines monovariétales. Thèse Doctorat. Microbiologie appliquée. Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi .
215. **Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., & Al-Daher, R. (2008)**. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.*3: 194-199.

Z

216. **Zarzuelo, A., Duarte, J., Jimenez, J. & Gonzales M. (1991)**. Utrilla Effet vasodilatateur de la feuille d'olivier. *Planta Med.* 57, P. 417 - 419.
217. **Zatoun, S & Ghanem, K. (2017)**. Etude quantitative et activité antioxydante du Punica granatum. Mémoire pour l'obtention diplôme de master en Génie chimique. université EChahid Hamma Lakhdar, El-Oued. pp: 09 -46
218. **Zehri, W. & Khoubzi S. (2020)**. Thème Contribution à l'évaluation de quelques caractères probiotiques de Lactobacillus. Mémoire de master. Université Mohamed Khider de Biskra.
219. **Zergoug, A. (2017)**. Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse doctora en Spécialité Microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. pp 5-12-13.
220. **Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018)**. Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed research international*, 2018, 1-15.
221. **Zuo, F. et al., 2015**. Characterization and in vitro properties of potential probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-fed infant feces.. *Annals of Microbiology* , 66(3), p. 1027–1037.

Site wibe:

 <https://www.clinisciences.com/achat/cat-gelose-nutritive-milieus-non-selectifs>

(Consulté le 07/06/2021)

ANNEXES

Annexe A : Dosage des polyphénols totaux.**Tableau 01 :** Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Concentrations (mg/ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Absorbances (nm)	0,759	0,785	0,831	0,85	0,891	0,897	0,97	0,9	1,032	1,034

Tableau 02: Valeurs de l'absorbance à 760 nm des quatre extraits des deux plantes

Plante	Feuille d'<i>Olea europaea</i>		L'écorce de <i>Punica Granatum</i>	
Extrait	E. Aqueux	E. hydro-EtOH	E. Aqueux	E. hydro-EtOH
Absorbance (nm)	0.773	0.775	0.812	0.791

Annexe B: Dosage des flavonoïdes**Tableau 03:** valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage de la quercétine

Concentrations (mg/ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0,1
Absorbances (nm)	0.079	0.205	0.318	0.342	0.42	0.482	0.559	0.904	0.693	0.869

Tableau 04: Valeurs de l'absorbance à 430 nm des quatre extraits des deux plantes

Plante	Feuille d'<i>Olea europaea</i>		L'écorce de <i>Punica Granatum</i>	
Extrait	E. Aqueux	E. hydro-EtOH	E. Aqueux	E. hydro-EtOH
Absorbance (nm)	0.799	0.154	0.814	0.453

Annexe C : Dosage des tanins.**Tableau 05:** valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage de la catéchine

Concentrations (mg/ml)	0.08	0.09	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0,8	0.9
Absorbances (nm)	0.046	0.05	0.55	0.083	0.158	0.2	0.253	0.387	0.493	0.394	0.512

Tableau 06: Valeurs de l'absorbance à 500 nm des quatre extraits dès les deux plantes

Plante	Feuille d'<i>Olea europaea</i>		L'écorce de <i>Punica Granatum</i>	
Extrait	E. Aqueux	E. hydro-EtOH	E. Aqueux	E. hydro-EtOH
Absorbance (nm)	0.130	0.092	0.049	0.333

Annexe D : Aspect microscopique

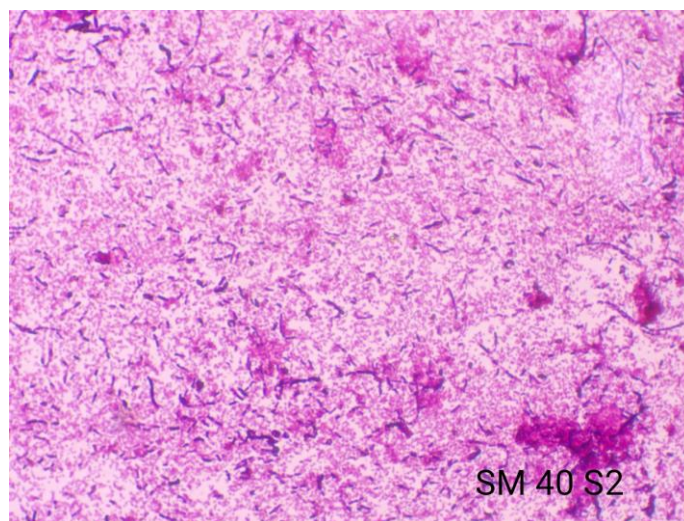
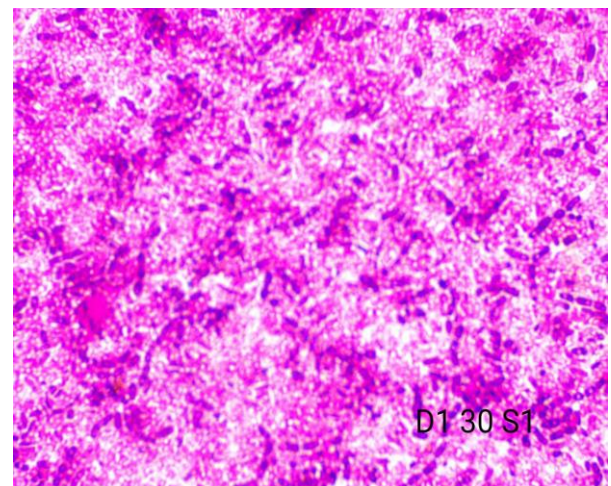
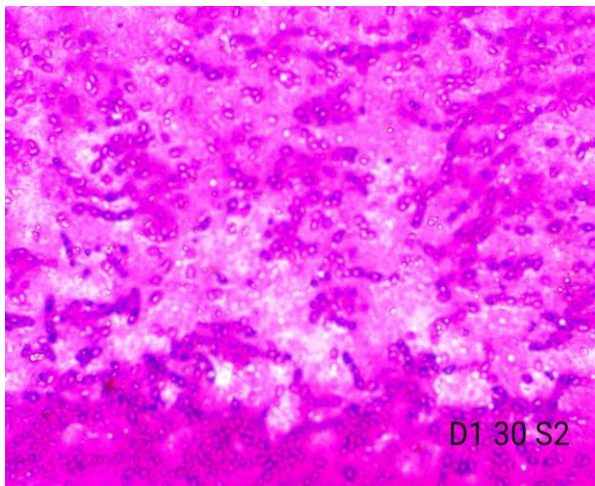


Figure 01 : Aspect microscopique des souches bactériennes

Annexes E : Test antibactérienne

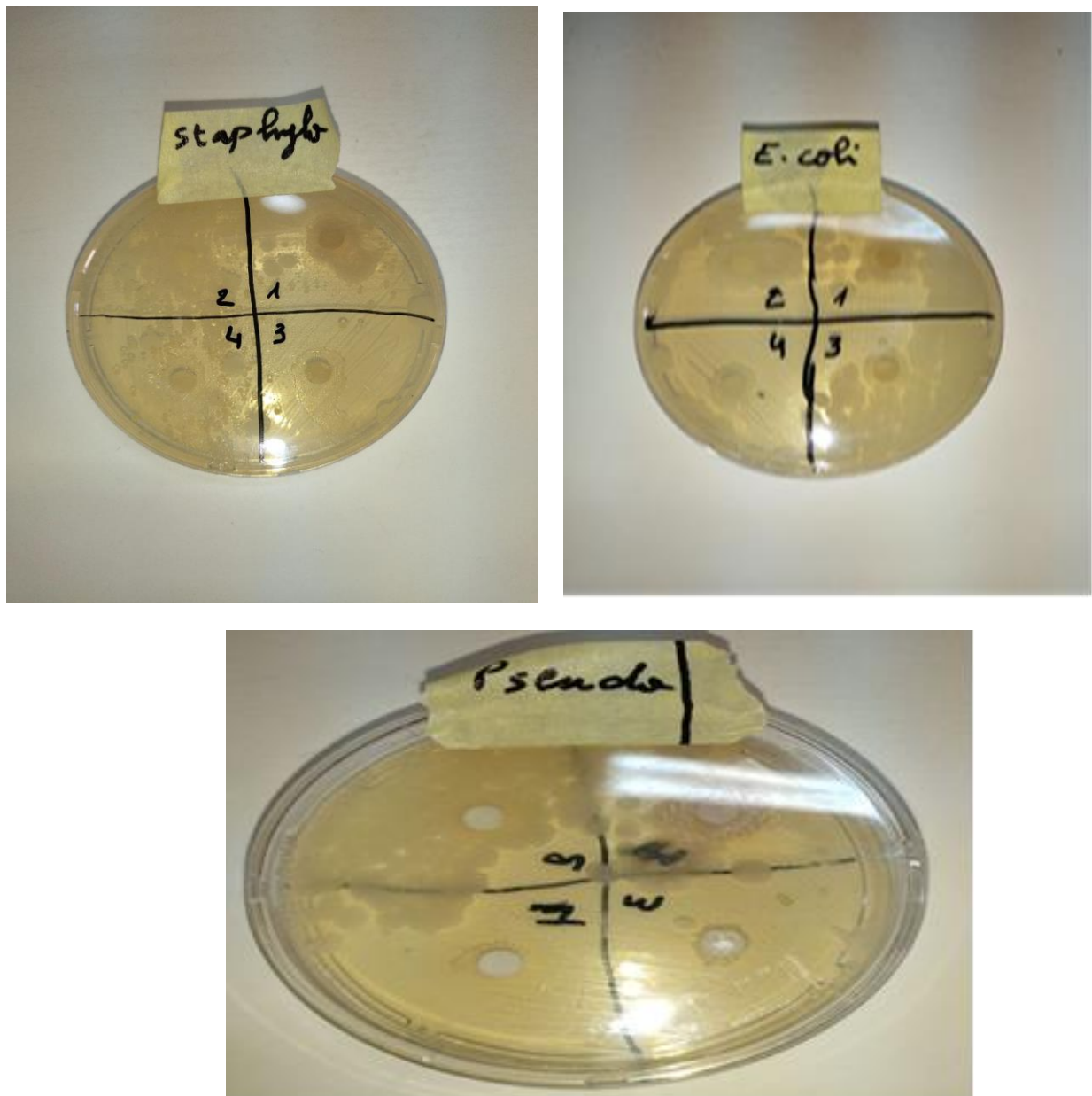


Figure 02 : Test antibactérienne en présence des les extraits

- 1: Extrait aquatique de feuille d'*Olea europaea L*
- 2: Extrait alcoolique de feuille d'*Olea europaea L*
- 3: Extrait aquatique de *Punica granatum L*
- 4: Extrait alcoolique de *Punica granatum L*

Annexes F : Tolérance au ph

Tableau 07 : Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait aqueux de PG

	ph=2		ph=3		ph=4	
	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h
Témoin	3,325	2,952	3,244	3,053	2,913	2,824
EA de PG	4,073	4,025	DN	3,635	3,390	3,889

Tableau 08: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait alcoolique de PG

	ph=2		ph=3		ph=4	
	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h
Témoin	3,325	2,952	3,244	3,053	2,913	2,824
E alcoolique de PG	4,602	3,273	4,151	3,505	3,739	3,454

Tableau 09 : Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait EA d'OE

	ph=2		ph=3		ph=4	
	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h
Témoin	3,325	2,952	3,244	3,053	2,913	2,824
EA de feuilles d'OE	2,952	4,301	3,396	4,176	3,575	2,477

Tableau 10: Effet de Ph acide sur la viabilité de la souche dans (log UFC/ml) en présence d'extrait E alcoolique d'OE

	ph=2		ph=3		ph=4	
	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h	t:0h	t:03h
Témoin	3,325	2,952	3,244	3,053	2,913	2,824
E alcoolique de feuilles d'OE	3,977	3,294	4,398	3,641	4,301	3,088