

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DE SCIENCES BIOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Alimentation Humaine et Qualité des Produits

Thème :

***INFLUENCE DES PARAMETRES
PHYSICOCHIMIQUES ET DE L'EXTRAIT
PHENOLIQUE DES FEUILLES D'OLEASTRE
SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES
PSYCHROTROPES***

Réalisé par : Melle Abderrahmani Nadia.
Melle Achite Nabila.

Soutenu le : 28/09/2015

Devant je jury composé de :

Mme BEN AHMED Djilali Adiba	Maitres de conférences classe A	UMMTO	Présidente
Mlle OUSSAID Saliha	Maitre-assistante	UMMTO	Promotrice
Mlle MESBAHI Naima	Maitre-assistante	UMMTO	Examinatrice
Mlle ALLEN Taous	Maitre-assistante	UMMTO	Examinatrice

2014 / 2015

En premier lieu, nous remercions remercies Allah le Tout Puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce travail.

Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien de nos parents que nous remercions infiniment pour leurs encouragements.

Nous tenons à remercier Mademoiselle Saliha Oussaid, la promotrice de notre mémoire pour son aide et sa disponibilité.

Merci aux membres du jury, d'avoir accepté de juger notre travail.

Et merci à tous qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Je dédié ce travail à

Mes chers parents, ma mère et mon père, qui m'ont entouré d'amour surtout au long de ces années d'études et qui m'ont toujours soutenu et encouragé pour aller de l'avant.

Mes chères sœurs Sabrina et Leaticia, et mon très cher frère Amar qui étaient toujours à mes côtés.

A l'âme de mon grand-père Omar que DIEU l'accueil dans SON paradis qui a toujours cru en moi.

A toute la famille Achite, et la famille Achir, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes.

Mes ami(e)s surtout Lynda.K qui était toujours derrière moi pour me soutenir.

NABILA

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents pour leur sacrifice, amour, tendresse et encouragement.

Mon frère : Salim.

Mes petites sœurs adorables : kamilia et mon ange Eline.

Mon fiancé : Mustafa qui a toujours cru en moi.

A toute la famille Abderrahmani et la famille L'hocini.

À mes cousins et cousines.

À tous mes amis(es).

NADIA

	Pages
Remerciements	
Table des matières	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	
Première partie : partie bibliographique	
I. Produits de la pêche.....	2
I.1 Généralité	2
I.2 Production et consommation mondiale.....	2
I.3 Les atouts nutritionnels des produits aquatiques	3
I.4 Altération des produits de la pêche.....	4
I.4.1 Altérations sensorielles	4
I.4.2 Altérations microbiologiques.....	5
I.4.3 Altérations autolytiques	7
I.4.4 Altérations biochimiques	8
I.4.4.1 La lipolyse.....	8
I.4.4.2 Oxydation des lipides.....	8
I.5 Techniques de conservation des produits de la pêche.....	9
I.5.1 Appertisation	9
I.5.2 Surgélation	9
I.5.3 Fumage, séchage, salage	10
II. Les psychrophiles et les psychrotrophes	11
II.1 Définition et répartition des psychrophiles.....	11
II.2 Etudes de deux cas de psychrotrophes.....	13
II.2.1 Pseudomonas	13
II.2.2 Streptococcus	14
II.3 Adaptation des psychrophiles au froid.....	15
II.4 Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes	17
II.4.1 Courbe de croissance.....	17
II.4.2 Sensibilité à la chaleur.....	17
II.4.3 Autres caractéristiques importantes.....	17
II.5 Application des psychrophiles dans les industries alimentaires	18
II.5.1 Industrie alimentaire	18
III. Les polyphénols des feuilles d'olivier sauvage et leur activité antibactérienne.....	19
III.1 Les polyphénols	19
III.1.1 Généralité	19
III.1.2 Classification des polyphénols	19
III.1.2.1 Les acides phénoliques.....	19
III.1.2.2 Les flavonoïdes	20
III.1.2.3 Les stilbénes	20
III.1.2.4 Les tannins	21

III.1.2.5 Les lignanes et lignines	21
III.1.3 Les propriétés des composés phénoliques	21
III.1.3.1 Piégeage des radicaux libres	21
III.1.3.2 Chélation des ions métalliques.....	21
III.1.3.3 Complixation moléculaire.....	22
III.1.4 L'alimentation et les polyphénols	22
III.1.5 Activités biologiques des composés polyphénoliques	23
III.1.6 Activités antibactériennes des polyphénols.....	24
III.1.7 Mécanismes d'action des polyphénols sur les bactéries.....	24
III.1.7.1 Inhibition du fonctionnement de la membrane plasmique.....	24
III.1.7.2 Inhibition du métabolisme d'énergie	24
III.2 L'olivier sauvage (<i>Olea europea sylvestris</i>).....	25
III.2.1 Généralité	25
III.2.2 Classification	25
III.2.3 Répartition géographique	26
III.2.4 Description botanique.....	26
III.2.5 Composition chimique.....	27
III.2.6 Propriétés biologiques	27
III.2.7 Utilisation traditionnelles	28

Deuxième partie : partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Evolution d'influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance bactérienne. 29	
1. Effet de la température	30
2. Effet du ph	30
3. Effet du NaCl	31
II. Effet antibactérienne de l'extrait phénolique de l'olivier sauvage.....	32
1. Extraction des composés phénolique	33
2. Dosage des polyphénols totaux	33
3. Evolution de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de l' <i>Oléastre</i> sur gélose Muller Hunton.....	34
4. Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI)	35
5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	36
III. Effet de la combinaison des différents facteurs sur la croissance avec le plan d'expérience	36

Résultats et discussion

I. Influence des paramètres physicochimiques sur la croissance des souches bactériennes	
1. Effet t de la température	37
2. Effet du pH	38
3. Effet du NaCl.....	38
II. Effet antibactérien de l'extrait phénolique des feuilles d' <i>Oléastre</i>	39
1. Extraction des polyphénols.....	39
1.1 Le taux d'extraction	40
1.2 Dosage des polyphénols.....	40
2. Evolution de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de l' <i>Oléastre</i>	41
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	44
4. Sensibilité des souches bactériennes aux divers antibiotiques	45

4.1 Les antibiotiques en disques	45
4.2 Les antibiotiques en solution	46
III. Effet de l'extrait phénolique des feuilles d' <i>Oléastre</i> sur la croissance bactérienne en fonction des paramètres physico-chimiques.....	48

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Ce présent travail porte sur le suivi de la croissance des bactéries psychrotrophes *Pseudomonas* et *Streptococcus* de référence et celle isolées à partir de l'espadon congelé, et l'étude de l'influence des paramètres physicochimiques (pH, température, NaCl) sur leurs prolifération.

Nous avons étudié l'effet antibactérien des extraits phénoliques des feuilles d'*Olea europaea sylvestris* sur les souches étudiées, et le test d'antibiogramme a révélé des zone d'inhibition qui varies de 8 à 12 mm pour la concentration de 100 mg/ml et inferieure à 7mm pour la concentration 25 mg/ml. Les résultats obtenus du test de l'antibiogramme montre une sensibilité des souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas Sp* envers l'extrait de l'oléastre, tandis que la souche *Streptococcus sp* présente une résistance.

Les résultats de l'étude de la croissance ont révélé que les températures de 27°C et 37°C favorisent la croissance pour les *Pseudomonas* et *Streptococcus* respectivement, et elle est réduite à 4°C. Et la gamme de pH étudié montre que ces souches sont neutrophiles. Tandis que l'étude de l'influence de NaCl dévoile que ces bactéries sont des non-halophiles.

Mots clés : psychrotrophes, *Olea europaea sylvestris*, polyphénols, activité antibactérienne, croissance bactérienne

This present work concerns the follow-up of the growth of the bacteria psychrotrophes *Pseudomonas* and *Streptococcus* of reference and that isolated starting from the swordfish frozen, and the study of the influence of the physico-chemical parameters (pH, temperature, NaCl) on their proliferation.

We studied the effect antibactérien phenolic extracts of the sheets of *Olea europaea sylvestris* on the studied stocks, and the test of antibiogramme revealed zone of inhibition which vary from 8 to 12 mm for the concentration of 100 mg/ml and lower than 7mm for the concentration 25 mg/ml. Results obtained of the test of the antibiogramme watch a sensitivity of the stocks *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas Sp* towards the extract of the oléastre, while the stock *Streptococcus sp* has a resistance.

The results of the study of the growth revealed that the temperatures of 27°C and 37°C support the growth for *Pseudomonas* and *Streptococcus* respectively, and it is reduced to 4°C. And the range of pH studies watch which these stocks are neutrophiles. While the study of the influence of NaCl reveals that these bacteria are thehalophilous ones.

Key words: psychrotrophes, *Olea europaea sylvestris*, polyphenols, antibactérienne activity, bacterial growth

N°	Titre	Page
1	Schéma du processus de la lipolyse	8
2	Répartition des psychrophiles dans la nature	11
3	courbe de croissance généralisée d'une culture bactérienne	17
4	Structures chimiques des acides phénoliques	20
5	Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes	20
6	<i>L'oléastre</i> de la station de l'Ourit de la région de Tlemcen	27
7	Protocole suivit pour l'étude de l'influence du pH sur la croissance bactérienne	31
8	Protocole suivit pour l'étude de l'influence de NaCl sur la croissance bactérienne.	32
9	Protocole des principales des étapes d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles <i>l'Oléastre</i>	33
10	Photos des zones d'inhibition exercée par les polyphénols d' <i>Oléastre</i> sur les souches.	42
11	Les photos correspondent aux résultats de tests d'antibiotiques en disques.	46
12	Les photos des zones marquées par les antibiotiques en solution	47

N°	Titre	Page
I	Bactéries lactiques isolées de produits de la mer et fréquence d'isolement selon les études	7
II	Classification des micro-organismes selon leur température Optimale de croissance	12
III	Quelques genres bactériens qui contiennent des espèces connues par leur développement au-dessous de 7°C	12
IV	Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes	14
V	Classification des streptocoques d'après une communication de J. Loubinoux (2014)	15
VI	La distribution de certains polyphénols dans les aliments	22
VII	Activités biologiques des composés polyphénoliques	23
VIII	Les diamètres des zones d'inhibition remarqués après l'incubation	42
IX	Les résultats de la CMI et CMB des quatre souches	44
X	Les résultats de sensibilité des souches envers les antibiotiques (en disques)	45
XI	Résultats de sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques en solution	47

Liste des abréviations

LABA	Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie
ADP	Adénosine diphosphate
AGL	Acides gras libres
AGMI	Acides gras monoinsaturés
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMP	Adénosine monophosphate
ARNr	Acide ribonucléique r
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
BHIB	Bouillon Brain Heart Infusion
BN	Bouillon nutritif
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CP	Composés phénoliques
CSP	Cold shock proteins
DG	Diglycérides
DLC	Date limite de consommation
DMSO	Dimethylsulphoxyde
DO	Densité optique
EAG	Equivalent d'acide gallique
ES	Extrait sec
GN	Gélose nutritive
Hx	Hypoxantine
Ino	Inosine
LDL	Low density lipoprotein
MG	Monoglycérides
MH	Muller Hinton
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
PP	Polyphénols
RL	Radicaux libres
TG	Triglycérides

T.M.A.O	Oxyde de triméthylamine
UFC	Unité formant des colonies
VLDL	Very low density lipoprotein

Introduction générale

Depuis toujours, l'homme consomme les produits de la pêche. Ces derniers constituent dans de très nombreuses régions du globe la base de son alimentation. Mais, la difficulté de conservation de cette denrée, est un véritable frein au développement de leur consommation **(Kodo, 1990)**.

Des méthodes de conservation ont été mises en œuvre constituant une part essentielle de la technologie alimentaire. Parmi lesquelles, on distingue la conservation à basse température à savoir : la congélation, la surgélation et la réfrigération permettant de ralentir ou d'arrêter la prolifération et l'action des micro-organismes. Toutefois, la conservation à froid favorise le développement de micro-organismes psychrotrophes surtout lorsque la chaîne du froid est rompue **(Nout et al., 2003)**.

La croissance des microorganismes psychrotrophes, au sein des denrées alimentaires, est dépendante de nombreux facteurs dont les plus importants sont la température, le taux d'humidité, la richesse en substances nutritives, le pH, l'oxygène et la pression osmotique. Dans le but de conserver et de garantir, au mieux, les qualités organoleptiques et sanitaires des aliments, la maîtrise de ces différents paramètres est, dans la mesure du possible, nécessaire à chaque étape de la chaîne de transformation.

Pour garantir la sécurité du consommateur, les technologues ont recours à l'utilisation des conservateurs naturels tels que les substances bioactives comme alternative aux substances chimiques.

Dans ce contexte, cette thématique a pour but d'étudier l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur la croissance des bactéries psychrotrophes, dont deux isolées de l'espadon congelé, à différentes variations, ainsi qu'à prouver l'efficacité de l'extrait des feuilles d'olivier sauvage autant qu'un agent antibactérien.

Pour répondre aux objectifs fixés à ce travail, nous l'avons mené comme suit :

Tout d'abord, la partie bibliographique qui comprend trois grands titres à savoir, les produits de la pêche, les psychrotrophes, et enfin les polyphénols des feuilles d'olivier sauvage et leur activité antibactérienne.

La partie « matériel et méthode » est réservée aux méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail, la préparation des échantillons et l'instrumentation utilisés sont décrites.

La partie consacrée à la présentation des résultats et à la discussion est divisée en deux parties : la première est consacrée à l'observation de l'influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance des bactéries psychrotrophes. La deuxième partie traite l'extraction des composés phénoliques, ainsi que leur activité antibactérienne contre ces souches.



*Synthèse des données
bibliographiques*

I. Les produits de la pêche

L'appellation « Produits de la pêche» regroupe des produits très différents dont certains ne sont pas consommables par l'homme. Parmi les produits de la pêche destinés à la consommation humaine, on trouve : les crustacés marins et d'eau douce (écrevisses, crabes...), les coquillages (provenant en grande partie de la conchyliculture), les céphalopodes (seiches, calamars...), les œufs et laitance (caviar et succédanés) et les poissons (**Kodo, 1990**).

I.1. Généralités

La filière des produits aquatiques est au centre d'importants enjeux environnementaux, alimentaires et socio-économiques (**FAO, 2012**). Cette filière est vaste et complexe regroupant de nombreux acteurs qui interviennent à divers niveaux : capture ou élevage des poissons, coquillages et crustacés, transformation, commercialisation mais aussi en amont pour la gestion des ressources halieutiques.

Au niveau production, on distingue deux secteurs : la pêche et l'aquaculture. Ces deux secteurs sont très diversifiés et non homogènes.

La pêche se divise en pêche côtière, pêche hauturière et pêche thonière pour produire de la pêche fraîche et de la pêche congelée.

L'aquaculture se divise en conchyliculture (ostréiculture, mytiliculture et cultures d'autres coquillages) et pisciculture (marine ou continentale). Les produits aquatiques peuvent être vendus directement au consommateur, ou passer par le secteur de la transformation ; ils peuvent aussi être exportés, ou provenir d'importations. Enfin, ils sont consommés sous forme de produits frais, de conserves, de produits traités, surgelés ou non.).

I.2. Production et Consommation mondiale

Selon l'organisation mondiale d'alimentation et d'agriculture, la production mondiale de produits aquatiques s'élève à 148,5 millions de tonnes en 2010, dont 88,6 millions de tonnes proviennent de la pêche et 59,9 millions de tonnes de l'aquaculture (**FAO, 2012**).

L'aquaculture en Algérie a relativement peu évolué. Depuis les années soixante-dix elle a conservé un caractère de démonstration, et, actuellement, l'aquaculture algérienne est en pleine expansion, avec jusqu'à l'heure actuelle une production de 3000 tonnes toutes filières confondues (poisson, moule, huître et algues).

La consommation de poissons s'est considérablement modifiée au cours des quarante dernières années. Dans l'ensemble, la consommation par personne par an a augmenté de manière constante et est passée de 9,9 kg en moyenne dans les années 1960 à 16,4 kg en 2005 et à 18,6 kg par habitant en 2010.

La consommation de poissons et de fruits de mer varie grandement selon les régions du monde. C'est en Afrique que la consommation a été la plus faible (9,1 kg par habitant), tandis que l'Asie a représenté les deux tiers de la consommation totale (20,7 kg par personne). Pour l'Océanie, l'Amérique du Nord, l'Europe, et l'Amérique latine, la consommation de poisson par habitant a atteint, respectivement, 24,6 kg, 24,1 kg, 22,0 kg et 9,9 kg (**FAO, 2012**).

I.3. Les atouts nutritionnels des produits aquatiques

Les produits aquatiques présentent une faible densité énergétique.

La plupart des poissons apportent peu de lipides: les poissons maigres moins de 3 % mais jusqu'à 14 % pour quelques espèces grasses. Dans tous les cas, ces acides gras sont qualitativement très intéressants.

La valeur calorique de 100 grammes de poisson est comprise entre 60 et 200 kcalories (**Bourgeois et al., 1996**).

Le poisson est une bonne source de protéines, indispensables notamment aux synthèses protéiques nécessaires pour la croissance et le renouvellement cellulaire. La teneur en protéines des produits aquatiques varie de 15 % à 25 % selon l'espèce considérée. De plus, ce sont des protéines de qualité car environ 50 % des acides aminés qui les composent sont des acides aminés essentiels. Elles possèdent également une bonne digestibilité.

Une source naturelle d'acides gras oméga 3 : Les poissons, coquillages et crustacés présentent une composition lipidique intéressante grâce à une bonne répartition entre acides gras saturés et insaturés.

Les poissons sont aussi un réservoir naturel de vitamines, minéraux et micronutriments.

Les produits aquatiques apportent en quantités intéressantes :

- des vitamines du groupe B comme les vitamines B12 (qui participe à la synthèse des globules rouges et des protéines), B3 (ou PP) (qui joue un rôle dans la production de l'énergie), B6 (indispensable pour le métabolisme des acides aminés) ;
- de la vitamine D (qui participe à la fixation du calcium sur les os) ;
- de la vitamine E (qui joue un rôle antioxydant) ;
- et de nombreux minéraux tels que l'iode, le phosphore, le sélénium, le fer, magnésium
- les produits aquatiques présentent une très bonne valeur nutritionnelle (**Guiraud, 1998**).

I.4. Altération des produits de la pêche

Les propriétés organoleptiques du poisson sont liées à la structure protéique et à la composition biochimique du muscle (**Kolodzieska, 1995**). En effet, les tissus de poisson sont riches en azote protéique et non protéique, tel que, les acides aminés, oxyde de triméthylamine ou T.M.A.O., et la créatine mais pauvres en hydrate de carbone, d'où un pH post mortem du muscle de poisson affecte considérablement les propriétés physiques du muscle (**Huss, 1999**). Chez les poissons gras, les principaux composés responsables des mauvaises odeurs sont les produits carbonyles issus de l'oxydation des lipides (**Eymard, 2003**). D'une manière générale, le changement et la dégradation post mortem des produits de la pêche sont sous l'action conjuguée des enzymes et des bactéries. Ceci se traduit par de complexes réactions de détériorations intrinsèques (autolyse, protéolyse et lipolyse) et extrinsèques (bactéries) (**Oumansour, 2001**). L'altération des produits de la pêche est essentiellement le résultat de phénomènes sensoriels et microbiologiques (**Food and Agriculture Organization., 2003**).

I.4.1. Altération sensorielle

La fermeté est un facteur important permettant d'évaluer la qualité de la chair d'un poisson cru. Il est maintenant accepté que les muscles de poisson se dégradent durant la conservation au froid (**Chéret, 2005**). Le changement sensoriel caractéristique chez le poisson en état post mortem varie considérablement suivant les espèces et la méthode de conservation (**Huss, 1999**). Une évaluation sensorielle du niveau de l'oxydation se traduit par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit (**Eymard, 2003**). En effet, le changement le plus important chez le poisson en état post mortem est l'établissement de la rigor mortis. Immédiatement après la mort du poisson, le muscle est détendu et la texture de la chair est

souple et élastique. Cette phase pré rigor ne dure que quelques heures. Ensuite, le muscle durcit et le corps du poisson se raidit. Ainsi le poisson est en état de rigidité cadavérique. Lors de cette phase, le pH chute à 6. Cette rigidité cadavérique s'installe à des temps différents selon les espèces et les conditions de conservation. Le muscle entre alors dans la phase post rigor et devient à nouveau souple (**Chéret, 2005**). Après un certain temps, les principaux mécanismes biochimiques se mettent en place conduisant à une altération progressive du muscle (**Dunajsky, 1979**).

De plus, l'altération sensorielle des produits de la pêche peut être caractérisée par la présence des taches de sang, de colorations anormales, d'odeurs et de saveurs désagréables, de production de gaz et formation d'une couche poisseuse, ou par l'aspect des branchies et des yeux.

I.4.2. Altération microbiologique

L'autolyse des muscles de poisson favorise la diffusion des lipides biologiques et la propagation des bactéries (**Kodo, 1990**). Normalement, la chair des poissons est stérile (**Guiraud, 1998**). Par contre, la peau, les branchies et l'intestin hébergent une flore commensale plus ou moins abondante, comprise entre 10^2 et 10^5 germes/cm² de peau, entre 10^3 et 10^7 germes/cm² de branchies et entre 10^3 et 10^8 germes/g de contenu intestinal (**Bourgeois et al., 1996**).

La flore bactérienne du poisson fraîchement pêché dépend de l'environnement dans lequel il est capturé, plus que de l'espèce elle-même (**Shewan, 1977**). En effet, la flore de la surface des poissons est constituée par des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, etc.... . La microflore des poissons est plus ou moins psychrophile selon la température de l'eau. Elle possède une température optimale de croissance aux environs de 15°C (**Morita, 1975**). La flore intestinale est constituée, dans tous les cas, de bactéries appartenances aux genres *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Clostridium* etc... .

Exemple d'une altération par les psychrophiles

La durée de conservation d'une crevette tropicale entière sur glace est d'environ 6 jours. La flore d'altération est alors principalement composée de *Pseudomonas fragi* et *Shewanella putrefaciens* (**Al-Dagal & Bazaraa, 1999**).

La crevette cuite est un produit prêt à consommer qui ne requiert pas d'étape finale de cuisson de la part du consommateur. Il faut donc être particulièrement vigilant par rapport aux

éventuelles contaminations par des bactéries pathogènes. *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène dont l'ingestion peut provoquer la listériose humaine, une maladie rare mais dont la létalité est élevée et peut aller jusqu'à 30% en fonction de la dose et de la fragilité du sujet. Elle est principalement d'origine alimentaire (**Hof, 2003**). Sa présence dans les produits prêts à consommer réfrigérés est problématique, due à sa nature psychrotrophe. Des investigations menées sur la fabrication des crevettes arctiques (*Pandalus borealis*) décortiquées cuites ont montré une contamination importante des usines et des matières premières par cette bactérie pathogène, mais probablement grâce à l'étape de cuisson aucune souche n'a été retrouvée dans les produits finis (**Gudmundsdottir et al., 2006**).

Par ailleurs, après la mort du poisson, les enzymes digestives détruisent la barrière intestinale et permettent la dissémination des germes présents. Les microorganismes des poissons des eaux tempérées sont dominés par les bactéries psychrotrophes (supportant le froid) appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* et *Flavobacterium* (**Huss, 1999**). Nombreux sont celles qui produisent des enzymes protéolytiques. Ainsi, même à basse température, la conservation ne pourra être que limitée dans le temps.

La dégradation bactérienne des produits de la pêche débute par la disparition de l'odeur caractéristique du poisson frais (odeur d'algue marine) et l'apparition progressive d'odeurs aigres ou acide puis aminées et soufrées, enfin ammoniacales et fécales (état putride). Ces modifications sont dues à la disparition de certaines substances et à l'apparition de déchet du métabolisme bactérien. Les acides aminés peuvent être soit désaminés en acides gras inférieurs, soit décarboxylés donnant naissance à des amines toxiques, tels que l'histamine, la tyramine et le tryptophane (**Kodo, 1990**). En effet, il y'a plusieurs bactéries spécifiques d'altération du poisson qui ont la particularité de pouvoir utiliser le T.M.A.O. comme accepteur d'électrons par respiration anaérobie (**Huss, 1999**).

L'intervention des microorganismes rend les produits de la pêche rapidement impropres à la consommation. Elle s'ajoute aux altérations enzymatiques et au rancissement du produit. Le tableau n° I représente quelques bactéries lactiques qui altèrent les produits de la pêche

Tableau I : Bactéries lactiques isolées de produits de la mer et fréquence d'isolement selon les études.

Produit	Référence	Genres/Espèces
Saumon frais emballé sous atmosphère modifiée	Emborg <i>et al.</i> , 2002	<i>Cb. maltaromaticum</i> (++)
	Rudi <i>et al.</i> , 2004	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Cb. divergens</i> (+++)
	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Ln. mesenteroides</i> (+), <i>Carnobacterium</i> spp. (++)
Crevettes	Al-Dagal & Bazaraa, 1999	<i>Streptococcus</i> spp. (+)
Truite fumée emballée sous vide	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Lb. sakei</i> (++) , <i>Lb. curvatus</i> (++) , <i>Lb. homohiochii</i> (+) , <i>Lb. plantarum</i> (+) , <i>Lb. delbrueckii</i> (+) , <i>Lb. casei</i> (+) , <i>Leuconostoc</i> spp. (+) , <i>Ec. faecalis</i> (+) , <i>Weissella kandleri</i> (+)
Hareng fumé emballé sous vide	Gancel <i>et al.</i> , 1997	<i>Lactobacillus</i> spp. (++)
Thon fumé sous vide	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Carnobacterium</i> spp. (++) , <i>Ln. mesenteroides</i> (+)
Surimi sous vide	Mauguin & Novel, 1994	<i>Ln. mesenteroides</i> (+)

(+++): flore majoritaire ; (++) : flore minoritaire ; (+) : isolement exceptionnel.

I.4.3. Altérations autolytiques

Suite à la mort du poisson, la dégradation de l'ATP est instantanée et se traduit chimiquement par sa disparition et par l'augmentation de plusieurs autres molécules (**Samuel et al., 2002**). De plus, la dégradation de l'ATP permet la formation de l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine(Ino) et l'hypoxantine (Hx). On considère que l'hypoxantine aurait un effet direct sur l'arrière-gout amer du poisson altéré. Actuellement, on considère, généralement, que l'IMP est responsable du goût recherché du poisson frais qui n'existe que dans les produits de la mer de première qualité (**Hughes & Jones, 1966**).

Les enzymes de la protéolyse autolytiques contribuent à la dégradation des tissus de la chair de poisson post mortem, conduisant à un ramollissement considérable du muscle (Chéret, 2005).

I.4.4. Altérations biochimiques

1.4.4.1 La lipolyse

La lipolyse est la principale voie qui conduit à la formation et l'accumulation d'acides gras libres (AGL), à partir d'esters de glycérol des glycérides et des phospholipides sous l'action des lipases endogènes et exogènes. Chez le poisson, l'hydrolyse se fait par les lipases et les phospholipases. Les lipases hydrolysent les liaisons ester des glycérides et libèrent à partir des triglycérides (TG) des acides gras libres (AGL), des diglycérides (DG) et des monoglycérides (MG) (Eymard, 2003).

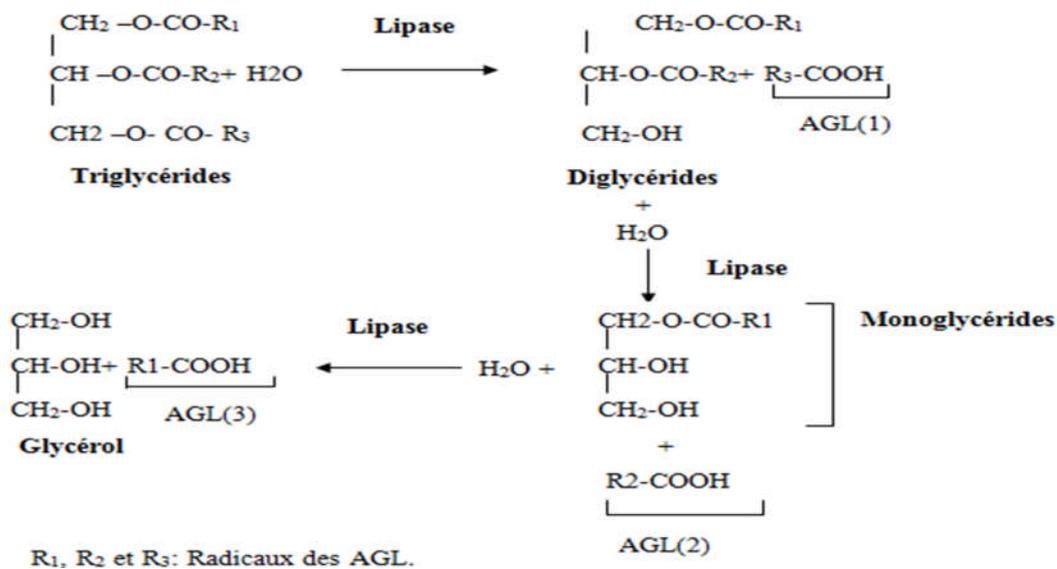


Figure 1 : Schéma du processus de la lipolyse

1.4.4.2 Oxydation des lipides

La présence de fractions d'acides gras polyinsaturés dans les lipides de poisson rend cette denrée très sensible à l'oxydation selon un mécanisme auto-catalytique (Huss, 1999). De plus, la chair de poisson s'oxyde très rapidement du fait de la présence des catalyseurs de l'oxydation tels que la myoglobine et les éléments minéraux (Cheftel, 1976 ; Oumansour, 2001). D'une manière générale et en présence d'oxygène moléculaire, l'oxydation des lipides est initiée principalement dans la fraction phospholipidique insaturée des membranes

cellulaires. Elle fait appel essentiellement à un mécanisme endogène de réaction en chaînes, de la nature radicalaire (**Rennerre, 2000**). En effet, les aliments contenant des lipides et notamment le poisson sont très sensibles à l'auto-oxydation. Cette réaction spontanée de l'oxygène atmosphérique avec la matière grasse est le processus le plus courant entraînant la détérioration des aliments par oxydation. En conséquence, il peut se produire des modifications de goût, d'odeur, de couleur et de stabilité au stockage (**Pelli & Lyly., 2003**).

I.5. Techniques de conservation des produits de la pêche

Le poisson non consommé à l'état frais est consommé par des techniques modernes ou traditionnelles dont le but est de ralentir les processus naturels de dégradation et d'augmenter, ainsi la durée de conservation. En effet, il est indispensable que le poisson soit traité pour être conservé lorsque la pêche est pratiquée dans des régions peu accessibles ou éloignées des grands centres de consommation et de commercialisation.

I.5.1. Appertisation

C'est en 1795 que Nicolas Appert invente ce procédé révolutionnaire de conservation, basé sur l'application conjointe de deux principes : destruction des microorganismes par la chaleur, et emballage en récipient étanche.

Les progrès constants de cette technologie permettent aujourd'hui de proposer aux consommateurs des produits de qualité aux nombreux avantages, dont :

- conservation optimale : préservés dans leur emballage hermétique, et à l'abri de la lumière grâce à l'opacité des boîtes, les produits de la mer appertisés gardent une excellente valeur nutritionnelle (protéines, taux élevés de vitamines B, C, B₁₂, acides gras essentiels...);
- sécurité des produits : le procédé de stérilisation suffit à lui seul à éliminer tous les microbes.

Au-delà de cette date, le produit est toujours consommable, mais le conserveur ne garantit pas qu'il reste à l'optimum de ses qualités gustatives.

I.5.2 Surgélation

Découverte en 1929 par Clarence Bridsey. Cette technique consiste à congeler une denrée saine et en parfait état de fraîcheur à une température égale ou inférieure à (-18°C) en tous points, puis maintenue à cette température pendant toute la durée d'entreposage

(Bonnell, 2012). L'utilisation de cette technique a donné naissance à une industrie des aliments surgelés.

I.5.3. Fumage, séchage, salage

Connus depuis la nuit des temps, le salage, le séchage et le fumage sont des techniques de conservation basées sur la réduction de la teneur en humidité et de l'activité de l'eau dans la chair du poisson. Les composés volatiles de la fumée provenant de la combustion du bois possèdent par ailleurs des actions bactériostatique et antioxydante.

Le salage le séchage et le fumage sont, pendant longtemps, restés les seules techniques utilisées pour la conservation du poisson. Aujourd'hui, avec l'évolution des habitudes alimentaires et grâce aux progrès industriels, le salage, le séchage et le fumage sont davantage utilisés pour leur action aromatisante et les caractéristiques organoleptiques qu'ils confèrent aux poissons que comme techniques de conservation au sens strict du mot. Afin de répondre à la demande des consommateurs en termes de goût, d'authenticité et de praticité, les « saleurs-saurisseurs » de poissons proposent une gamme de produits extrêmement large en espèces (hareng, morue, saumon, maquereau, truite, haddock, saumonette,...) et en présentations (entier, nature, à l'huile, en salades prêtes à consommer, en produits à tartiner,...

II. Les psychrotrophes

II.1. Définition et répartition des psychrophiles

Une grande partie de la surface terrestre, marine et terrestre, est périodiquement ou de manière permanente est relativement froide, et que la plupart des écosystèmes sont exposés à de basses températures (Feller & Gerday, 2003). Ainsi qu'une grande partie de la biosphère terrestre n'atteint jamais des températures supérieures à 5 °C (Junge, et al., 2011; Margesin, 2008). Près de trois quarts de la terre sont couverts par les océans (Abdel-Megeed, 2004) et 90 % de leur volume ont une température de -1 à 5°C (Margesin & Miteva, 2011).

La figure 2 ci-dessous présente la répartition des bactéries psychrophiles dans la nature, ce qu'est remarquable est que les la majorité de ce genre se trouve dans les océans, le sol, les eaux, et les denrées alimentaires élaborés, tandis qu'il se présente avec des petites quantités dans l'air et la glace.

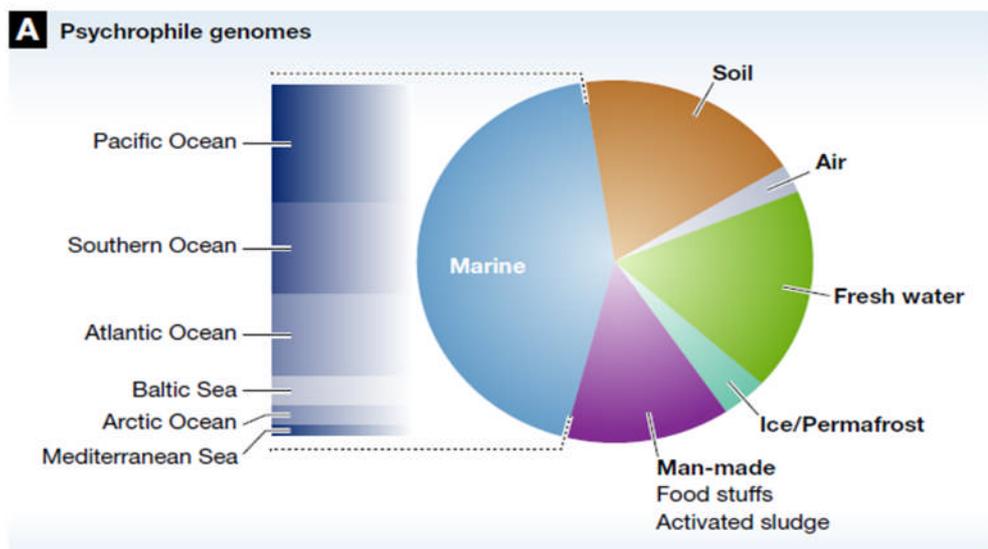


Figure2: Répartition des psychrophiles dans la nature

En raison de ces conditions climatiques extrêmement dures, on croyait depuis longtemps que ces environnements étaient dépourvus de vie. Cependant, des études récentes sur l'écologie et la diversité microbienne ont montré que même dans ces conditions inhospitalières (Suzuki, et al., 2001) une grande diversité de micro-organismes a été trouvée (Junge, et al., 2011) et que malgré l'effet négatif des basses températures sur les réactions biochimiques, ces organismes se reproduisent, croissent et se déplacent, ils ont donc développé des adaptations diverses leur permettant de compenser les effets préjudiciables de la basse température (Gerday, et al., 2000).

Ces micro-organismes sont classés comme psychrophiles (préfèrent le froid) ou psychrotrophes (tolèrent le froid) (**Van Stempvoort & Biggar, 2008**). Ces deux groupes présentent une grande diversité microbienne, on y trouve des archées, de différents genres de bactéries à Gram négatifs et Gram positifs (**tableau III**). Ils sont répandus dans les environnements naturels (**Gounot, 1986**) et dans les nourritures (**Leveau , et al., 2001**)

Tableau II. Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance (**Catteau M. 1999 ; Fournaud J,1982**).

	Thermophiles	Mésophiles	Psychrophiles
Valeurs entre lesquelles se situe la température optimale de croissance du micro-organisme	+40°C et +55°C	+20°C et +40°C	+5°C et +20°C

Tableau III : Quelques genres bactériens qui contiennent des espèces connues par leur développement au-dessous de 7°C (**Jay, et al., 2005**).

Gram négatifs	Nombre relatifs	Gram positifs	Nombres relatifs
<i>Acinéto bactérie</i>	XX	<i>Bacille</i>	XX
<i>Aéromonas</i>	XX	<i>Clostridium</i>	XX
<i>Alcaligènes</i>	X	<i>Corynebactérie</i>	X
<i>Alteromonas</i>	XX	<i>Enterocoque</i>	XXX
<i>Entérobactérie</i>	XX	<i>Lactobacille</i>	XX
<i>Escherichia</i>	X	<i>Lactococcus</i>	XX
<i>Pseudomonas</i>	XXX	<i>Leuconostoc</i>	X
<i>Psychrobacter</i>	XX	<i>Listeria</i>	XX
<i>Salmonelles</i>	X	<i>Microcoque</i>	XX
<i>Serratia</i>	XX	<i>Pédiocoque</i>	X
<i>Shewanella</i>	XXX	<i>Vagococcus</i>	XX
<i>Vibrio</i>	XXX	<i>Macrocoque</i>	X
<i>Acetobacterium</i>	XX	<i>Paenibacillus</i>	X
<i>Yersinia</i>	XX	<i>Staphylocoque</i>	X

X : faible abondance ;
XX : forte abondance ;
XXX : très forte abondance.

II.2. Etudes de deux cas de psychrophiles

II.2.1 *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (**Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004**).

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (**Palleroni, 2008**).

Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fût entreprise par (**Anzai *et al.* 2000**). En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient au groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

- Le groupe des *P. syringae*.
 - Le groupe des *P. chlororaphis*.
 - Le groupe des *P. fluorescens*.
 - Le groupe des *P. putida*.
 - Le groupe des *P. stutzeri*.
 - Le groupe des *P. aeruginosa*.
- et le groupe des *P. Pertucinogena*.

Les *Pseudomonas* exercent une protéolyse sur les produits alimentaires. La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis les produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de l'aliment.

Les *Pseudomonas* se caractérisent aussi par une activité lipolytique importante. La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance, et favorise le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés en méthylcétones (tableau IV).

Tableau IV: Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes

Produit concerné	Modification constatée	Agent
Lait	Coloration bleue	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Beurre	Couleur verte	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Toutes denrées	Amertume	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Toutes denrées	Gout fruité (de fraise)	<i>Pseudomonas fragi</i>

II.2.2 Streptococcus

Les *Streptococcus* regroupent un vaste ensemble de microorganismes ubiquitaires et qui comprend de nombreuses espèces. En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes.

Ce sont des coques gram positifs de 0,5 à 1 µm de diamètre, présentant un groupement typique en diplocoques (deux coques) ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés. Aéro-anaérobie facultatifs (ou aérobie tolérant), ils se développent aussi bien en absence d'oxygène qu'en présence.

La classification des streptocoques est basée sur l'hémolyse autour des colonies observée sur gélose au sang de cheval. L'aspect de l'hémolyse permet de distinguer les streptocoques β-hémolytiques et les non β-hémolytiques. Il n'y a pas lieu de distinguer l'hémolyse de type α laquelle est dépendante des conditions de culture.

En 2014, le genre comprend 104 espèces différentes. Parmi ces espèces celles des groupes mitis et bovis sont très proches d'un point de vue phylogénique et difficile à identifier, d'autant qu'il existe entre ces espèces des échanges génétiques par transformation.

Tableau V : classification des streptococcus d'après une communication de J. Loubinoux (2014)

Streptocoques β-hémolytiques	<p><i>Streptococcus pyogènes (groupe A)</i> <i>Streptococcus agalactiae (groupe B)</i> <i>Streptococcus dysgalactiae (groupe C,G)</i> <i>Streptococcus anginosus/ constellatus/ intermedius (S.milleri)</i> <i>Streptococcus canis / porcinus/ equi subsp. zooepidemicus/ suis</i></p>
Streptocoques non β-hémolytiques	<p>Groupe anginosus : <i>Streptococcus anginosus/ constellatus /intermedius</i> Groupe mitis :<i>Streptococcus pneumoniae/ pseudopneumoniae/mitis/ oralis</i> Groupe sanguins : <i>Streptococcus sanguinis/ parasanguinis/ gordonii</i> Groupe mutans : <i>Streptococcus mutans</i> Groupe salivarius : <i>Streptococcus salivarius</i> Groupe bovis : <i>Streptococcus gallolyticus/ pasteurianus/ lutetiensis/ infantarius</i></p>

Les streptococcus sont des bactéries de la peau et des muqueuses de l'homme ou de l'animal. Un certain nombre d'espèces sont retrouvées préférentiellement au niveau de certains sites (la peau, la gorge, les muqueuses respiratoires, les muqueuses génitales de la femme et enfin les muqueuses digestives).

II.3. Adaptation des psychrophiles au froid

Les bactéries psychrophiles ont su s'adapter à des environnements où les températures ambiantes sont proches du point de congélation de l'eau en évoluant génotypiquement et/ou phénotypiquement (Gounot, 1991). Pour surmonter les effets négatifs des basses températures tous les composants de la cellule ; des membranes et des systèmes de transport des corps dissouts intracellulaires, des acides nucléiques et des protéines, doivent être adaptés (D'Amico et al., 2006). Idem, des processus cellulaires fondamentaux du

métabolisme, la réplication, la transcription et la traduction doivent également être accommodés pour résister au froid (Cavicchioli, et al., 2002).

Les mécanismes de ces adaptations demeurent mal définis, mais une conclusion générale a été tirée ; pour faire face à de basses températures, toutes les structures comprenant des membranes doivent avoir une flexibilité et une fluidité suffisante pour assurer des fonctions multiples (Gounot, 1991 ; Scherer & Neuhaus, 2006). Le degré de cette fluidité est régulé par les acides gras des phospholipides membranaires par :

- Une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés;
- diminution de la longueur de chaîne moyenne d'acide gras ;
- augmentation des acides gras polyinsaturés (Thomas & Dieckmann, 2002 ; Van Stempvoort & Biggar, 2008).

D'autres modifications peuvent survenir telles que :

- L'augmentation de la quantité ou la nature des acides gras ramifiés ;
- diminution de la proportion d'acides gras cycliques et donc une augmentation d'acides gras monoinsaturés (Beales, 2004 ; Margesin & Miteva, 2011).

En plus, six protéines de choc froid (cold shock proteins : CSP) ont été identifiées chez *Lactococcus lactis* (Wouters et al., 1999a), et d'autres chez *Streptococcus thermophilus* (Wouters et al., 1999b), *Lactobacillus delbrueckii* (Serror et al., 2003) et *Lb. plantarum* (Mayo et al., 1997) . La plupart des études menées sur l'adaptation au froid a porté sur le choc froid (passage rapide de la température optimale de croissance à une température suboptimale) et non sur la croissance à basse température.

Un autre changement a été observé mais négligé ; c'est l'augmentation d'épaisseur de la paroi cellulaire. Ceci n'a été rapporté que pour *Pseudomonas fluorescens* résistant au froid, qui a montré une augmentation de deux fois d'épaisseur de paroi cellulaire (Scherer & Neuhaus, 2006).

II.4. Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes

II.4.1 Courbe de croissance

Les bactéries psychrotrophes présentent, aux températures de réfrigération, une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence longue, pouvant durer

plusieurs jours, et par une pente très faible au cours de la phase de croissance exponentielle, témoignant d'un allongement important du temps de génération. Plus la température est proche de la température limite inférieure de croissance et plus la multiplication est lente.

Des écarts très faibles de température peuvent avoir une incidence notable sur l'activité de la flore psychrotrophe. Ainsi, si une température de +2°C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès +4°C. Il faut aussi noter que les différentes capacités métaboliques ne subissent pas toutes une inhibition identique. Ainsi, à +4°C, les *Pseudomonas* ont une croissance lente mais présentent une importante activité de synthèse d'enzymes qui réalisent l'hydrolyse du substrat alimentaire (Bourgeois., Mesclé et Zucca 1996).

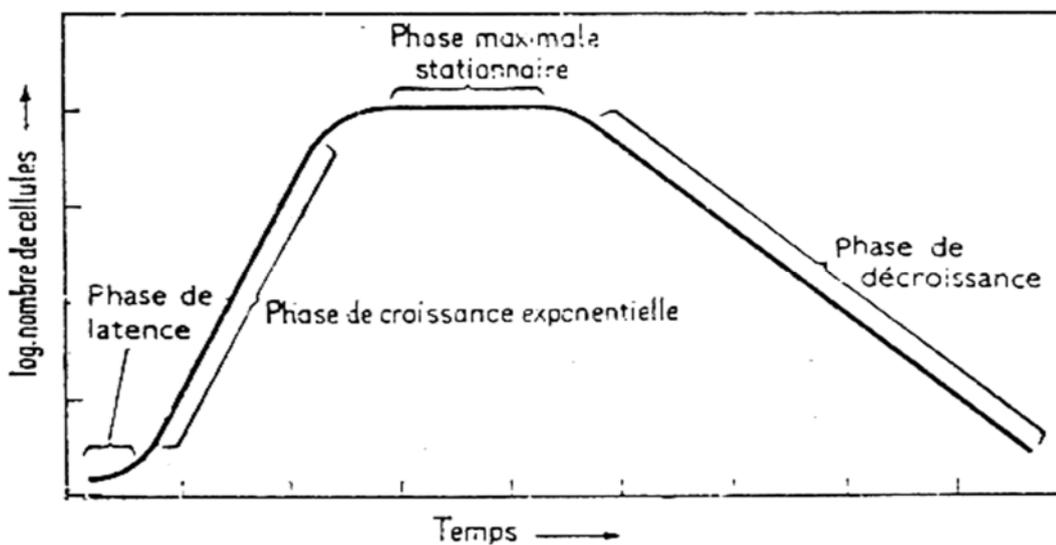


figure 3 : courbe de croissance généralisée d'une culture bactérienne (Stanier et al., 1966)

II.4.2. Sensibilité à la chaleur

Les bactéries psychrotrophes présentent une sensibilité particulière au stress «chaud», caractérisée en particulier par une température maximale de croissance inférieure à +45°C et une température létale inférieure à +50°C. On peut ainsi citer les températures limites de croissance suivantes : +35°C pour *Acinetobacter*, +40°C pour *Alcaligenes*, +43°C pour *Pseudomonas* et +45°C pour *Listeria monocytogenes* (Larpent, 1995).

II.4.3. Autres caractéristiques importantes

En ce qui concerne l'influence du pH, il faut noter que la plupart des bactéries psychrotrophes sont neutrophiles. Seules font exception à cette règle les bactéries lactiques et

Listeria monocytogenes qui tolèrent des pH acides jusqu'à une valeur limite de 5 (**Larpen J1995**). Le genre *Pseudomonas* est très exigeant en eau libre et ne se développe bien que pour des valeurs d'activité de l'eau (A_w) supérieures à 0,98 (**Bourgeois., Mescle . et Zucca,1996**). Au contraire, *Listeria monocytogenes* résiste à des conditions hostiles. Elle tolère jusqu'à 10 % de chlorure de sodium (**Larpen, 1995**) et son A_w limite de croissance est de 0,86.

II.5. Application des psychrophiles dans les industries alimentaires

Les organismes psychrophiles et leurs produits ont des applications potentielles dans un large éventail de procédés industriels, agricoles et médicales (**Gerday et al., 2000 Abdel-Megeed, 2004 ;**). Leurs utilités dérivent de leur souplesse inhérente (**Cavicchioli et al., 2002**).

II.5.1. Industrie alimentaire

Les enzymes psychrophiles sont des candidats idéaux pour certaines applications en industrie alimentaire. Les applications possibles de ces enzymes adaptés au froid sont nombreuses, par exemple:

- ❖ Dans l'industrie laitière, la B-galactosidase est utilisée à basse température afin de réduire la quantité de lactose responsable de graves intolérances induites dans environ les deux tiers de la population mondiale ; et convertir le lactose du lait ;
- ❖ Dans l'industrie fromagère, les protéases, peuvent être potentiellement utiles dans la maturation accélérée des fromages de lente-maturation qui exigent des conditions à basse température (**Gounot, 1991 ; Huston, 2008**).

III. Les polyphénols des feuilles d'olivier sauvage et leur activité antibactérienne

III.1. Les polyphénols

III.1.1 Généralité

Les composés phénoliques (CP) forment un très vaste ensemble de substances dont plus de 8000 sont connues (**Williamson et Manach, 2005**). Ils sont les produits du métabolisme secondaire (molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures) des végétaux et sont distribués dans tous les organes de la plante (**Apak et al., 2007**).

Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une fonction éther, ester, ou hétéroside (**Handique et Baruah, 2002**).

Les composés phénoliques diffèrent dans leur structure selon le nombre et la position deshydroxylations et méthylations du cycle aromatique (**Bourgou et al., 2008**).

III.1.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent être divisés en une dizaine de classes en fonction de leur structure de base relative au nombre et à la position des groupements hydroxyles et méthyles sur le squelette de base. Ils s'étendent de molécules simples telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que les tannins.

III.1.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques englobent les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (figure 1).

Les acides hydroxybenzoïques ne sont pas présent sous forme libre, estérifiée ou glycosylée. Ils ne se trouvent que dans un petit nombre de plantes et l'acide gallique étant l'acide hydroxybenzoïques le plus répandu (**Frank, 2004**).

Les acides hydroxycinnamiques sont les acides phénoliques les plus communs. Ils sont rencontrés notamment sous leurs forme glycosylée ou estérifiée par l'acide quinique, shikimique et tartarique (**Clifford, 2000**).



Figure 4 : Structures chimiques des acides phénoliques (Dicko et al., 2006).

III.1.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large des composés polyphénoliques. Ils sont classés en flavonols, flavones, flavanones, chalcones, flavanes, isoflavones, flavanols et anthocyanes (figure 2) (Derbel et Ghedira., 2005). Du fait de leurs propriétés antioxydantes, liées à leur structure polyphénolique, les flavonoïdes ingérés avec nos aliments sont réputés pour protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants (Stoclet et Schini-Kerth., 2011).

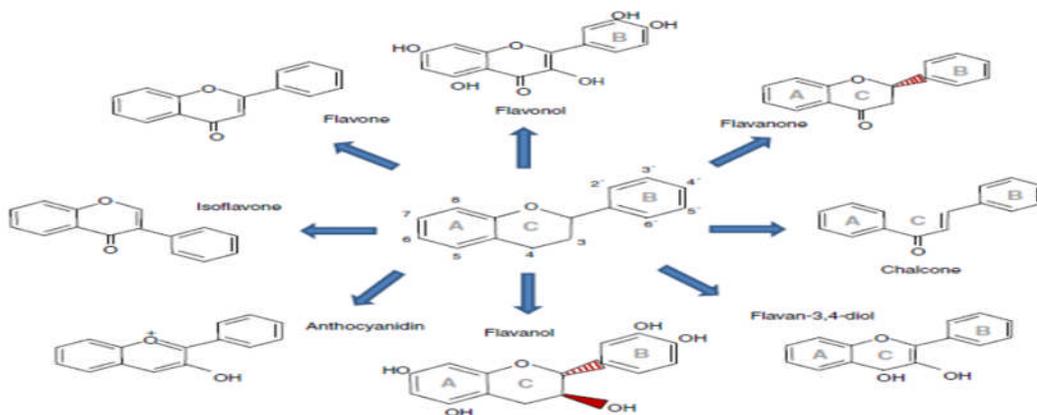


Figure5 : Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes (Fraga et Oteiza., 2011)

III.1.2.3. Les stilbènes

Les Stilbènes sont structurellement caractérisés par la présence d'un noyau 1,2-diphényléthylène avec des substituants hydroxyles sur le noyau aromatique. Ils existent sous forme de monomères et d'oligomères. Le composé le plus connu est le résveratrol, possédant un squelette trihydroxystilbène (Roupe et al., 2006).

III.1.2.4. Les tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Yao et al., 2004).

III.1.2.5. Les lignanes et lignines

Les lignines, structurellement liées aux lignanes, font aussi partie des CP. Ils résultent de la polymérisation de trois monolignols, les alcools coumarique, coniférylique et sinapylique (Begum et al., 2004).

D'un point de vue fonctionnel, la lignine confère une rigidité à la paroi et empêche la dégradation des polysaccharides pariétaux, de ce fait elle agit comme ligne de défense contre les pathogènes, insectes et autres herbivores (Hatfield et Vermerris, 2001).

D'autres classes de CP existent telles que les coumarines, les sécoiridoïdes, les diferuloylméthanés ou curcumines (Rayan et al., 2002).

III.1.3. Les propriétés des composés phénoliques

III.1.3.1. Piégeage des radicaux libres

La fonction phénol a un caractère plus acide que les autres groupements alcools. Elle perd facilement un proton H⁺ pour former l'ion phénolate. La perte d'un hydrogène (proton + électron) engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. Cette réactivité chimique confère aux CP leur caractère antioxydant (Ferreira et al., 2007 ; Wang et al., 2008).

III.1.3.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols présentent la capacité de fixer des ions de transition tels que le fer et le cuivre. Ils peuvent de cette manière inhiber la génération des radicaux libres (RL) par la réaction de Fenton (Anghileri et Thouvenot, 2000 ; Ebrahimzadeh et al., 2008).

III.1.3.3. Complexation moléculaire

Le noyau phénolique est une unité très favorable à l'interaction avec les protéines. Les interactions peuvent être covalentes ou non covalentes (**Papadoulou et Frazier, 2004 ; Prigent, 2005**).

Ces interactions sont, à titre d'exemple, à l'origine de la sensation d'astringence, lors de l'interaction avec les protéines salivaires riches en proline (**Luck et al., 1994 ; Bennick, 2002**), et l'inhibition de certaines enzymes.

III.1.4. L'alimentation et les polyphénols

Toutes les plantes renferment des CP et sont, à ce titre sources potentielles d'antioxydants (**Dimitrios, 2006**). Les principales sources alimentaires des CP sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales et les graines oléagineuses. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en PP, les boissons telles que les jus de fruits et surtout le café et le thé en apportent le reste (**Cieslik et al., 2006**).

Tableau VI : La distribution de certains polyphénols dans les aliments (**King et Young, 1999**)

Les composés phénoliques	Sources alimentaires
Flavonols : quercétine, kaempferol, myricétine, fistine	Olive , oignon, laitue, choux, pomme, chicorée, thé vert, banane, tomate ciboulette
Flavonols : apigénine, lutéoline	Olive , céleri
Flavonols : catechine, epicatechine	Poire, thé, pommes...
Isoflavonones : genisteine, daidzeine	Soja, tofu
Acides hydroxycinnamiques : acides caféique, ferrique, l'orogénique	Myrtille, cerise, poire, pomme, haricots de collée, jus de cerise et de pomme, kiwi, prune, aubergine, pomme de terre, épinards
Acide hydroxybenzoïques : acide gallique et allergique	Framboise, fraise, jus de raisin, mure, cassis
Tannins condensés : catéchine, polymère d'épi catéchine	Raisin, fraise, framboise, noix, prune, pêche, chocolat, vin rouge, thé, café, cidre
Stilbénes : resveratrol	Arachides, raisin

III.1.5. Activités biologiques de composés polyphénoliques

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature faisant partie de l'alimentation animale. A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10 g de ces composés par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le tableau I.

Tableau VII: Activités biologiques des composés polyphénoliques

Classes de polyphénols	Activités	Références
Acide phénoliques	Anti carcinogènes Anti mutagènes Anti oxydants	Ferguson, 2001 Sarni-Manchado et Chenyier,2006
Stilbènes	Inhibent l'oxydation des LDL et l'agrégation des plaquettes	Sarni-Manchado et Chenyier,2006
	Anti carcinogènes anti mutagènes	Ferguson, 2001
Coumarines	Anti carcinogènes anti mutagènes Degestibilité des protéines	Ferguson, 2001 Lazoui et al., 2006
Flavonoïdes	Anti carcinogènes anti mutagènes Anti oxydants	Ferguson, 2001 Alothane et al., 2009
Anthocyanes	Anti oxydants Colorants	Sarni-Manchado et Chenyier,2006 Ferguson, 2001
Tannins	Anti oxydants Anti tumoral Digestibilités des protéines	Mousavinejade et al., 2009 Lazoui et al., 2006
Lignines	Anti carcinogènes anti	Ferguson, 2001

	mutagènes	
Proanthocyanidines	Anti inflammatoires	Ferguson, 2001
	Anti bactériens anti fongiques	

III.1.6. Activité antimicrobienne des polyphénols

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

III.1.7. Mécanismes d'action des polyphénols sur les bactéries

III.1.7.1. Inhibition du fonctionnement de la membrane plasmique

Les flavonoïdes lipophiles pourraient perturber les membranes bactériennes par l'interaction de ces molécules avec la partie polaire de la membrane alors que le cycle benzène hydrophobe et les chaînes aliphatiques ramifiées sont accumulés dans la partie hydrophobe intérieure de la membrane bactérienne. (Al-Bayati, 2007 et Liolios, 2009).

Il est admis que le groupement hydroxyle des phénols réagit en tant que porteur transmembranaire des protons, de potassium et d'autres cations monovalents (Calsamiglia et al., 2007). Par conséquent, la perte de la fluidité de la membrane cellulaire des bactéries provoquée par l'action des sophoraflavanones sur les régions hydrophiles et hydrophobes des liposomes (Scalbert et Williams, 2000).

III.1.7.2. Inhibition du métabolisme d'énergie

Le mécanisme d'action des polyphénols contre les bactéries pathogènes pourrait être relié à l'inhibition des protéines de transport membranaire ou à leur interaction avec les protéines vitales à titre d'exemples :

Les tannins jouent leur rôle antibactérien par la déficience des bactéries en ion fer ou par interactions non spécifiques avec les hydrates de carbone (Al-Bayati

et *al.*, 2008). Comme Les flavonoïdes inhibent aussi les spores bactériennes (Friedman, 2007).

III.2. L'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*)

Les produits végétaux sauvages récoltés ont généralement une valeur soit de consommation, ou commerciale. Parmi eux, on retrouve les arbres d'oliviers sauvages, connus sous le nom oléastres (*Olea europaea* subsp *europaea* var *sylvestris*) (Campbell et Luckert., 2002).

Pour les botanistes, l'olivier cultivé est appelé *Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*, alors que l'oléastre est de variété *sylvestris*. L'olivier est cultivé tandis que l'oléastre est sauvage.

Il existe trois cas possibles d'oliviers à l'état sauvage :

- l'oléastre : l'olivier sauvage qui n'a aucun parent domestiqué parmi ses ancêtres ;
- c'est l'olivier féral : l'olivier sauvage descendant d'oliviers cultivés ;
- L'olivier cultivé qui a été abandonné ; seul son aspect peut évoquer l'Oléastre. Il n'existe que grâce à l'intervention de l'homme, puisque c'est un olivier appartenant à une variété cultivée ou ayant été cultivée.

III.2.1. Classification

L'olivier appartient à la famille des *Oléacées*. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon (Ghedira, 2008) est la suivante :

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre: *Olea L.*

Espèces: *Olea europaea L.*

III.2.3. Répartition géographique

L'olivier (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (**Lavee, 2013**).

Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur (**Breton et al., 2008**).

III.2.4. Description botanique

L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile (**Terral et Arnold-Simard., 1996**). Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids (**figure3**). Une corrélation élevée et significative des dimensions du fruit et la teneur en huile a été observée. Cela pourrait être d'intérêt pour l'utilisation des oliviers sauvages. En dépit de cela, il convient de mentionner que les oliviers sauvages avec des poids de fruits 1,3 g et le pourcentage d'huile d'olive dans la matière sèche 33,8 % est comparable aux valeurs mentionnées pour certains cultivars d'oliviers (**Hannachi et al., 2008**).



Figure 6 : L'oléastre de la station de l'Ourit de la région de Tlemcen.

III.2.5. Composition chimique

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance représentés par les actéosides, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques ainsi que d'autres composés (**Owen et al., 2004**).

L'arôme particulier d'huile d'olive est dû à une gamme de composants présents en très faibles quantités tels que les alcools, les composés polyphénoliques, la chlorophylle, les caroténoïdes, les stérols, les tocophérols et les flavonoïdes, et ils contribuent à la qualité organoleptique comme le goût, la saveur et la valeur nutritive (**Doveri et Baldoni., 2007**). L'huile d'olive vierge est particulièrement appréciée pour sa grande stabilité par rapport aux autres huiles végétales et de sa teneur élevée en constituants tels que les acides gras mono insaturés (AGMI) et les composés phénoliques (**Bendini et al., 2006**).

Les acides gras dominants sont les acides gras monoinsaturés (AGMI) dont l'acide oléique (C 18:1), et les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide linoléique (C 18 : 2) et l'acide linoléique (C 18:3) (**Salas et al., 2000**). Les fruits de l'olivier (*Olea europea* L.) et ses produits dérivés représentent une source connue de plusieurs composants naturels d'une bioactivité importante tels que les antioxydants dont les caroténoïdes, les tocophérols, les flavonoïdes et les composés phénoliques, parmi lesquels les plus abondants sont les secoiridoides comme l'oleuropéine et le diméthyloléuropéine (**Bianco et Uccella., 2000**).

Les feuilles de l'arbre contiennent des quantités variables d'oligo-éléments en fonction de plusieurs facteurs: de la physiologie végétale, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille (**Perrinjaquet-Moccetti et al., 2008**).

III.2.6. Propriétés biologiques

- Les composés phénoliques des feuilles l'olivier agissent comme :
 - des agents antioxydants ;
 - anti-inflammatoires ;
 - antiviraux ;
 - anti-cancérogènes ;
 - anti-hypertensive ;

- hypoglycémique ;
- hypocholestérolémiantes (**Visioli et al., 2002**).
- Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (**Ghanbari et al., 2012**).
- les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles d'olivier diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardiovasculaires (**Huang et al., 2010**).
- L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminées (**Polzonetti et al., 2004**).

III.2.7. Utilisation traditionnelle

Les feuilles contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs, donc elles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. (**Wainstein et al., 2013**). Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée.

Les feuilles ont été largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre. (**Ghedira., 2008**).

Matériels et méthodes

La partie expérimentale de notre travail a été effectuée au sein du laboratoire commun physico-chimique et du laboratoire de microbiologie du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

L'objectif de cette étude est de suivre l'influence des paramètres physico-chimiques et de l'extrait brut des feuilles de l'olivier sauvage sur la croissance des bactéries psychrotrophes.

Les bactéries utilisées pour effectuer ce travail sont des souches psychrotrophes à savoir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT, récupérées du laboratoire de recherche LABAB de Tizi-Ouzou, *Pseudomonas Sp* et *Streptococcus Sp* isolées d'Espadon congelé.

Le suivi de la biomasse de ces bactéries a été effectué par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm.

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (température, pH, oxygène, etc...). Donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une bactérie donnée va permettre de connaître sa distribution écologique et de contrôler son développement.

I. Influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance bactérienne

L'ensemble des expériences qui vont suivre ont pour but de connaître l'impact de chaque paramètre sur la croissance des bactéries ciblées.

❖ Préparation des suspensions bactériennes

A partir de culture bactérienne jeune nous avons prélevé quelques colonies pour les inoculer dans le BHIB dans des tubes stériles (pour les quatre souches).

Ensuite, nous avons standardisé la charge de l'inoculum en mesurant la densité optique (DO) comprise dans l'intervalle allant de 0.08 à 0.1, est équivalente à une charge bactérienne de 10^7 UFC/ml à 625nm. Nous avons préparé jusqu'à la dilution 10^4 UFC/ml.

I.1.1. Effet de la température

La température est un facteur qui affecte profondément les micro-organismes, comme tous les êtres vivants. En effet, les micro-organismes sont particulièrement sensibles à la température parce qu'ils sont unicellulaires et que leur température varie avec celle du milieu extérieur.

Mode opératoire

Nous avons préparé une dilution de 10^3 UFC/ml dans le BHIB pour les quatre souches ensuite nous avons incubé à 4°C et 27°C pour les *Pseudomonas*, et 4°C et 37°C pour *Streptococcus*.

La densité optique a été mesurée chaque 24 h à 625nm pendant 5 jours.

I.1.2. Effet du pH

Le pH est un facteur qui influence considérablement la croissance bactérienne. Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane cytoplasmique à l'encontre des ions H^+ . Chaque espèce se développe dans une gamme définie de pH et possède un pH optimum de croissance.

Mode opératoire

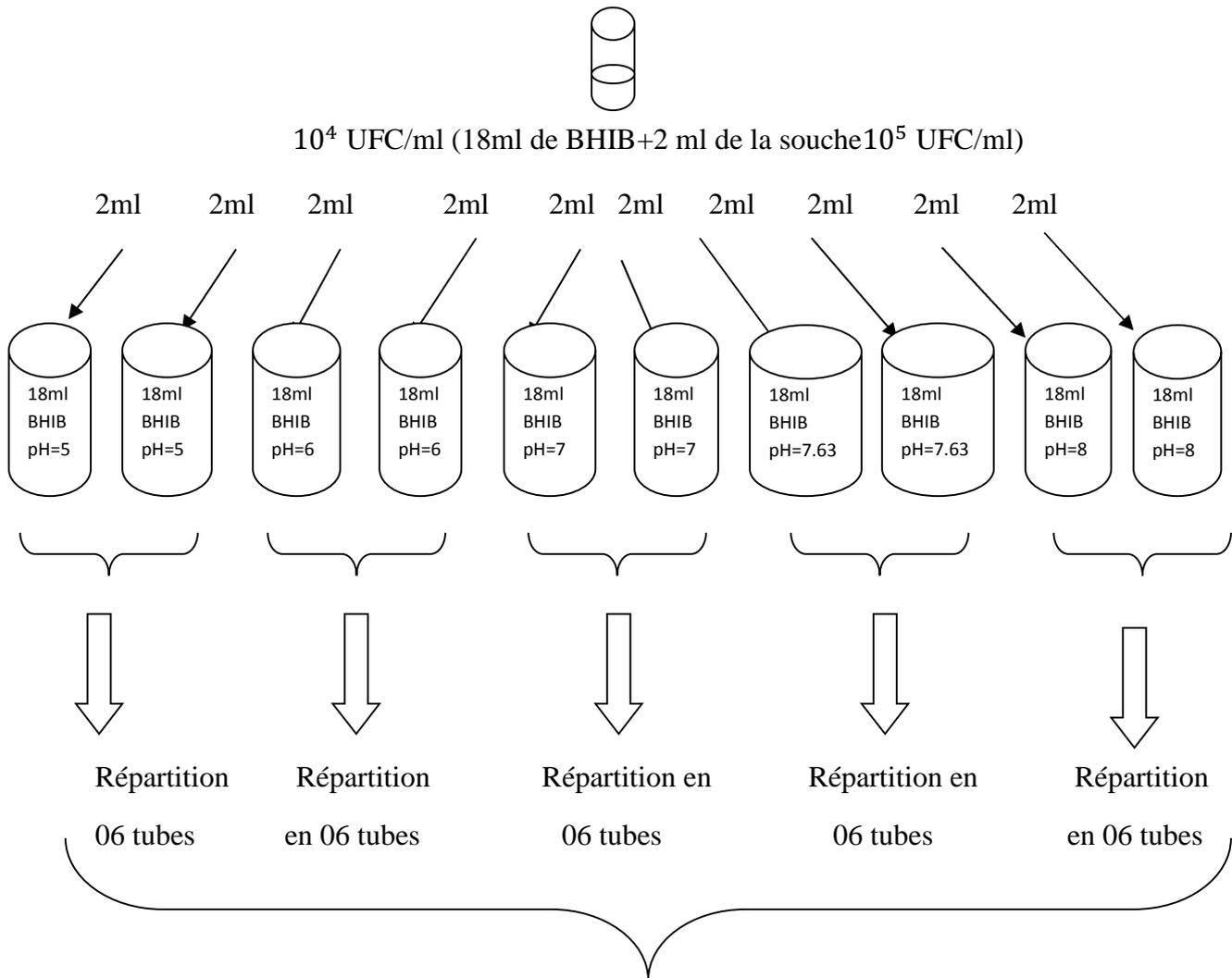
❖ Préparation de milieu de BHIB à différents pH

Nous avons préparé le BHIB à différentes valeurs de pH (pH=5, pH=6, pH=7, pH=7.63 et pH=8) en ajoutant soit de HCl (pour avoir un pH acide), ou de NaOH pour un pH basique.

❖ Ensemencement des bactéries

A partir de la dilution 10^4 UFC/ml, nous avons ensemencé les tubes à différent pH et c'est ainsi qu'on réalise la dilution 10^3 UFC/ml. Ensuite, nous avons incubé les tubes à 4°C et à 27°C pour les *Pseudomonas*, et 4°C à 37°C pour les *Streptococcus*.

La lecture de la DO se fait chaque 24 h pendant 5 jours à 625 nm.



Incubation des tubes (03 tubes / 06 tubes à 4°C et 03/06 à 27°C= *Pseudomonas*) et (03/06 à 4°C et 03/06 à 37°C= *Streptococcus*)

Figure 7 : Protocole suivi pour l'étude de l'influence du pH sur la croissance bactérienne.

I.1. 3. Effet du NaCl

Les bactéries, à l'exception des *Mycoplasmatales*, sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de NaCl par litre.

Mode opératoire

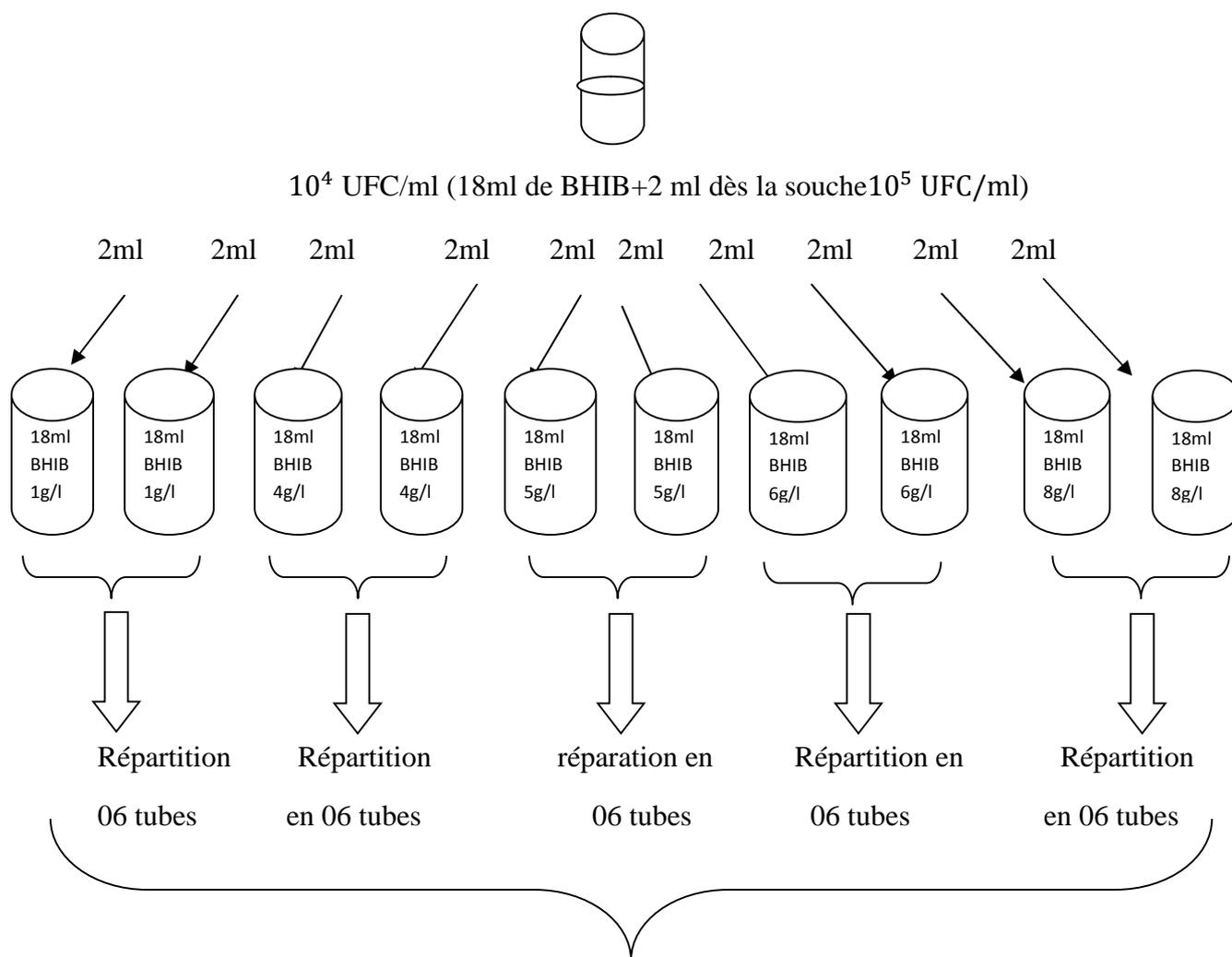
❖ Préparation de BHIB à différent concentration de NaCl

En ajoutant le NaCl à différentes quantités, nous avons préparé une gamme de concentration ([NaCl]=1g/l, [NaCl]=4g/l, [NaCl]=5g/l, [NaCl]=6g/l, [NaCl]=8g/l).

❖ **Ensemencement de bactéries**

Après avoir réalisé les dilutions jusqu'à 10^4 UFC/ml, nous avons réalisé la dilution 10^3 UFC/ml en ensemençant les tubes à différente concentration de [NaCl] (pour les quatre souches). Puis on les a incubées à 4°C et à 27°C pour les *Pseudomonas*, et à 37°C pour les *Streptococcus* pendant 24 h.

La lecture de la DO se fait chaque 24 h à 625 nm pendant 5 jours.



Incubation des tubes (03 tubes / 06 tubes à 4°C et 03/06 à 27°C = *Pseudomonas*) et (03/06 à 4°C et 03/06 à 37°C =*Streptococcus*)

Figure 8 : Protocole suivi pour l'étude de l'influence de NaCl sur la croissance bactérienne.

II. Effet antibactérien de l'extrait phénolique de l'olivier sauvage

Les feuilles d'olivier sauvage sont récoltées au mois de Janvier 2015, dans la région de d'IGUERADLOUNE (Ouacif), wilaya de Tizi-Ouzou.

Les feuilles de *l'Oléastre* sont soumises à un nettoyage et un séchage à l'étuve à 40°C, jusqu'à la stabilité du poids puis à une étape de broyage à l'aide d'un Broyeur D56 (Model France) ; la poudre est ensuite tamisée par un tamis dont le diamètre des pores est de 200 µm, puis conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.1. Extraction des composés phénoliques

Les différentes étapes suivies pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de l'olivier sauvage sont présentées dans le schéma suivant (figure 9):

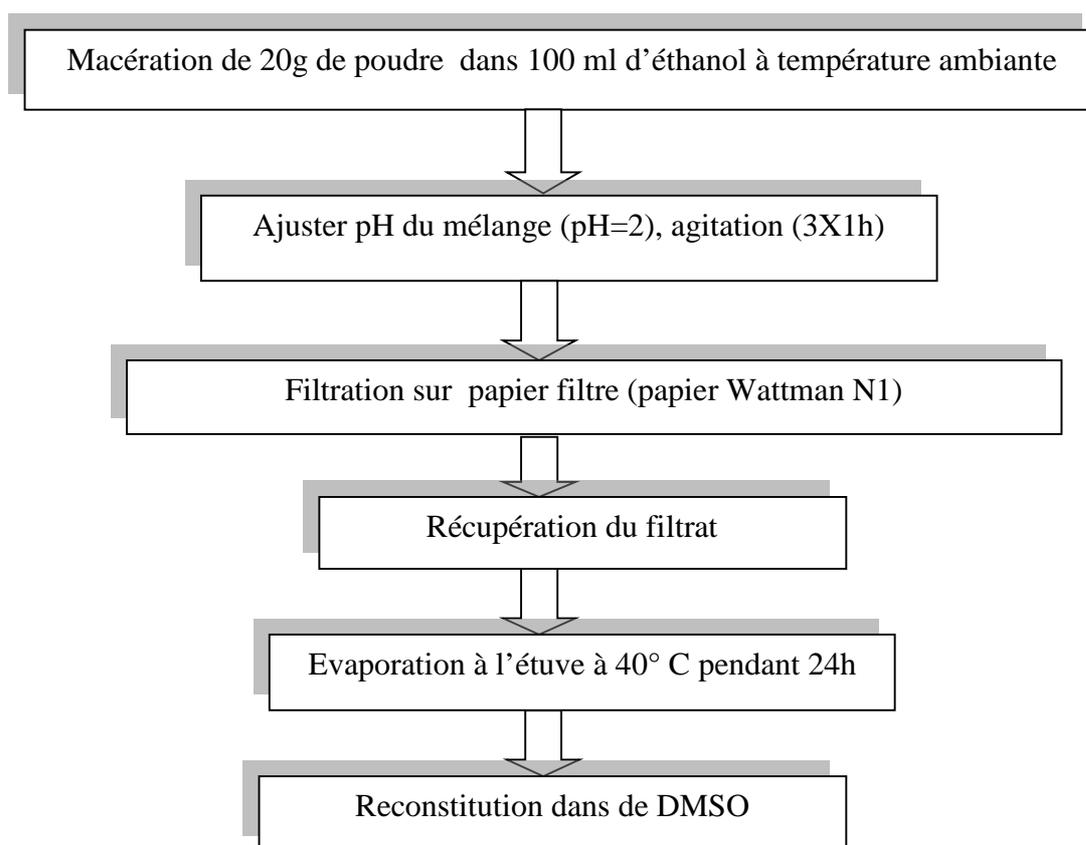


Figure 9 : Protocole des principales étapes d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles l'oléastre

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(p_1 - p_0) / E] \times 100$$

Avec :

P_0 : poids du cristalliseur vide (g)

P_1 : poids du cristalliseur après évaporation (g)

E : poids de la poudre initiale (g)

II.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le dosage est fondé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacide). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides d'où la formation d'un complexe bleu (Daels, 1999).

Mode opératoire

Le protocole utilisé est celui décrit par Singleton *et al*, (1999).

Dans un tube à essai, nous avons introduit 50µl d'extrait et 250 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après dix mn, nous avons ajouté 750 µl de la solution de Na₂CO₃ à 20% et 950 µl d'eau distillée. L'ensemble ainsi obtenu est incubé à température ambiante pendant deux heures. La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760nm.

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations précises d'acide gallique comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

II.3. Evolution de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de l'Oléastre sur gélose Muller Hunton

Cette partie a pour objectif de tester l'activité antibactérienne des feuilles d'olivier sauvage. Quatre souches psychrotrophes ont été ciblés à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, et *Pseudomonas Sp*, *Streptococcus Sp* isolées d'Espadon congelé.

Mode opératoire

Nous avons prélevé quelques colonies bactériennes à partir de la culture jeune sur gélose nutritive (GN) pour les dissoudre dans l'eau physiologique stérile dans un tube stérile.

Ensuite, nous avons standardisé la charge de l'inoculum en mesurant la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre en partant du principe que, la densité optique (DO) comprise

dans l'intervalle allant de 0.08 à 0.1, est équivalente à une charge bactérienne de 10^7 UFC/ml à 625nm

Des disques en papier wattman n°4 de 6 mm de diamètre sont préparés et autoclaves à 120°C pendant 20 mn.

L'ensemencement de la gélose Muller Hunton (MH) est réalisé par écouvillonnage. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne de la dilution 10^7 UFC/ml, puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrés. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 90° à chaque fois.

Une fois les boîtes ensemencées, les disques de diamètre de 6 mm ont été déposés sur la gélose à une distance égale les uns des autres. Les disques sont imprégnés de 20 µl de l'extrait à différentes concentrations (100, 50, 25, 6.25, 3.125 mg/ml). Le témoin négatif est réalisé avec le DMSO.

Incubation des boîtes pendant 24 h à 27°C pour les *Pseudomonas aeruginosa*, et *Pseudomonas Sp*, et à 37°C pour les *Streptococcus pyogenes*, et *Streptococcus Sp*.

Des combinaisons (10µl de chaque antibiotique) et entre les antibiotiques et l'extrait (10µl d'antibiotique + 10µl d'extrait) ont été aussi testées. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques.

II.4. Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible d'un organisme après 24h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. C'est l'approche la plus utilisée pour évaluer *in vitro* l'activité d'un antibiotique.

Mode opératoire

Selon **Djenane et al., (2012)** des dilutions ½ en série de l'extrait brut sont préparées dans une gamme de concentration de 50 à 0.781 mg/ml dans le bouillon nutritif (BN). Ainsi que des dilutions des suspensions bactériennes des quatre souches ont été réalisées (jusqu'à 10^3 UFC/ml).

Dans des Eppendorf stériles, nous avons disposé dans chaque un 570 µl de bouillon nutritif (BN) et 30 µl de la suspension bactérienne (10^3 UFC/ml) 600 µl de chaque solutions

d'extrait phénolique préparées préalablement à des concentrations de 50-0.781 mg/ml sont versés dans les premiers tubes. Le dernier tube contient seulement 1170 µl de bouillon nutritif (BN) et 30 µl de la suspension bactérienne, utilisé comme témoin négatif. Le volume final de chaque tube est de 1200 µl (cette étape est réalisée pour les quatre souches).

Incubation à 27°C pour les *Pseudomonas aeruginosa*, et *Pseudomonas Sp*, et à 37°C pour les *Streptococcus pyogenes*, et *Streptococcus Sp* pendant 24 h.

Après incubation des tubes, et l'apparition des troubles dans quelques tubes.

II.5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB par définition, c'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99.99% (soit 0.01% de survivants) après 24 h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique.

Mode opératoire

A l'aide d'un écouvillon, nous avons réalisé deux stries sur gélose nutritive à partir du témoin positif, et deux stries à partir des tubes présentant peu de troubles. Nous avons incubé les boîtes de *Pseudomonas* à 27°C et celles de *Streptococcus* à 37°C pendant 24 h.

III. Effet de la combinaison des différents facteurs sur la croissance avec le plan d'expérience.

Après l'étude de l'impact de chaque paramètre physicochimique individuellement sur la croissance des bactéries, l'étude de leurs interactions fait l'objet de la prochaine étape, et ça dans le but de connaître les meilleures combinaisons qui inhibent la prolifération bactérienne, pour le faire un plan factoriel est réalisé.

Résultats et discussion

Plusieurs travaux ont présenté les effets biologiques de l'olivier cultivés montrant ses valeurs médicinales (Bisignano et al., 1999 ; Cowan, 1999 ; Sudjana et al., 2009 ,). Par contre, peu d'études ont été réalisées sur l'olivier sauvage, en particulier en Algérie. De ce fait, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne des feuilles d'*Olea europea* var *sylvestris*.

Notre travail consiste en l'étude de l'influence des paramètres physicochimiques (température, pH, NaCl) et de l'extrait phénolique des feuilles d'olivier sauvage sur la croissance de quatre bactéries psychrotrophes altérant les produits de la pêche.

I. Influence des paramètres physicochimiques sur la croissance des souches bactériennes

Tous ces résultats, sont obtenus par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm .

1. Effet de la température

La température est l'un des paramètres importants de la croissance bactérienne. Elle peut en effet modifier le taux de croissance.

Le suivi de la croissance bactérienne en fonction de la température a ciblé *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Pseudomonas sp*.

Nous avons incubé à deux températures différentes à savoir 4°C et 37°C pour les souches de *Streptococcus* et à 4°C et 27°C pour les souches de *Pseudomonas* les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la température a un effet positif sur la vitesse de croissance. Par contre, elle est ralentie à de basse température (4°C). *Pseudomonas* et *Streptococcus* ont un taux de croissance considérable à la température qui tend vers la température maximale que la minimale.

La basse température (4°C) a provoqué un ralentissement très net de la croissance des bactéries et notre résultat est en accord avec les résultats de Nedwell (1999) qui a expliqué que cette diminution de la vitesse de croissance des micro-organismes à basses températures est due à la réduction de la fluidité de la membrane qui entraîne une efficacité moindre des systèmes de transport transmembranaires.

2. Effet du pH

Un autre facteur important de la croissance des bactéries est le pH, car il va déterminer l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire.

Notre recherche est menée sur l'étude de l'influence du pH d'une gamme allant de 5 à 8 sur les quatre bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas sp*, *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT, et *Streptococcus sp*.

Les résultats ont révélé que la croissance de *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT présente un grand développement à pH 6 à 37°C et à pH 7.63 à 4°C, tandis que la croissance la plus faible est marquée à pH de 5 pour les deux températures.

La souche *Streptococcus sp*, à 4°C ainsi qu'à 37°C, a manifesté un développement important à pH de 8, alors qu'à pH de 5, a marqué une faible prolifération.

Les résultats de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Pseudomonas sp* ont dévoilé que :

Le pH optimal de croissance pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est de 7.63, tandis qu'il est difficile de déterminer la valeur du pH qui ralentit la croissance. En effet, à toutes les valeurs du pH nous avons marqué un développement semblable et cela pour les deux températures 4°C et 27°C.

Alors que *Pseudomonas Sp*, les variations du pH n'ont pas d'influence sur sa croissance à 27°C mais à 4°C et à pH de 8, nous avons observé une croissance importante. Nous avons remarqué une inhibition de la croissance de cette bactérie à 4 °C en fixant le pH à 5. Selon **Japón-Luján (2008)** le pH d'un aliment est aussi un facteur important affectant l'activité d'une substance antimicrobienne. A faible pH, l'hydrophobicité de certaines molécules augmente et par conséquent, elles se répartissent convenablement dans la phase lipidique du produit. Ces molécules peuvent aussi se dissoudre plus facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne et renforcer ainsi leur action antimicrobienne.

3. Effet du NaCl (pression osmotique)

Les résultats obtenus d'étude de l'influence de la concentration du NaCl sur la croissance de *Streptococcus pyogenes* ATCC 27853, et *Streptococcus sp* incubées à 4°C et 37°C, ainsi que sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC CECT, et *Pseudomonas sp* incubées à 4°C et 27°C ont dévoilé que :

La souche de *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT à 4°C avec la concentration de 5 g/l de NaCl a marqué un développement important contrairement à la concentration de 6g/l de NaCl. A 37°C et avec toutes les valeurs de NaCl testées, nous avons remarqué un taux de développement semblable, et donc difficile de déterminer la valeur inhibitrice de la croissance de cette bactérie.

La souche *Streptococcus sp* a manifesté un important développement à 5g/l de NaCl. La croissance est ralentie à la concentration de 1g/l.

Pour les souches de *Pseudomonas* à différentes concentrations de NaCl ont montré que les souches présentent presque le même développement. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les bactéries ont une bonne tolérance générale au sel (**Marchandin, 2007**).

L'étude menée par **Keskin et Ekmekçi (2008)** sur l'impact de la concentration de NaCl sur le développement de *Pseudomonas aeruginosa* a montré qu'une concentration de 7% exerce un effet bactéricide, tandis qu'une concentration de 5% exerce un effet bactériostatique sur la souche étudiée.

II. Effet antibactérien de l'extrait phénolique des feuilles d'Oléastre

1. Extraction des polyphénols

La méthode d'extraction utilisée pour récupérer les composés phénoliques des feuilles de l'Oléastre est l'extraction solide-liquide. Son principe est de séparer les substances phénoliques du reste des composants. En effet, les teneurs en composés phénoliques varient d'une plante à une autre, mais aussi sont fonction de nombreux paramètres à savoir le type d'extraction, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules.

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes et leurs activités biologiques est influencée par plusieurs paramètres : la température influence de façon significative sur le taux d'extraction des polyphénols, car le séchage à haute température pourrait modifier la composition chimique des composés de départ, alors qu'un séchage mal mené favoriserait les contaminations fongiques et les oxydations enzymatiques (**Eloff et McGaw, 2006**).

Le taux d'extraction des composés phénoliques est aussi influencé par la granulométrie de la poudre. En effet, la réduction de cette dernière augmente le taux d'extraction (**Pinilo et al., 2005 ; Sipigno et al., 2007**).

1.1 Le taux d'extraction

Le choix du solvant à utiliser dépend de la nature des composés à extraire et leur solubilité dans le solvant.

D'après **Contini et ses collaborateurs (2008)**, les mixtures de solvants polaire ; acétone, méthanol et éthanol avec l'eau à des proportions de 70%-80% donnent des résultats d'extraction satisfaisants.

Nous, notre choix s'est reposé sur l'éthanol 70% afin d'extraire le maximum possible des composés phénoliques en respectant les résultats obtenus par **Ouali et Souci (2014)**

Taux d'extraction (%) = 26,05%

Une étude similaire sur l'olivier sauvage a été faite par **Ouali et Souci (2014)**, le taux d'extraction trouvé a été de 33.61% avec l'éthanol 70%. En le comparant avec notre résultat de 26.05% on remarque un grand écart. Cet écart peut être expliqué par le changement des facteurs environnementaux tels que la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc. Ces facteurs doivent être examinés pour leur rôle clé dans la composition chimique des extraits obtenus à partir des feuilles d'oliviers. Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent sur la proportion relative des composés principaux caractéristiques.

1.2 Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le dosage par ce réactif donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al., 2007**).

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent mg d'acide gallique par gramme d'extrait sec et déterminées par l'équation de type : $y = 0,001 x + 0,1$ avec $R^2 = 0,998$.

La teneur en polyphénols des feuilles d'olivier sauvage est de $258,035 \pm 18,89$ mg EAG/g ES.

2. Evolution de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de l'oléastre

L'analyse globale des résultats obtenus par la méthode de diffusion sur gélose, démontre que cette méthode est adéquate pour évaluer d'une manière qualitative et rapide que soit-elle l'activité antimicrobienne de divers agents antimicrobiens (Fisher et al., 2006). Cette technique d'antibiogramme est utilisée en bactériologie médicale est employée aussi pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles extraites des plantes (Gulcin, 2004). Elle a l'avantage d'avoir une grande souplesse et de s'appliquer sur un grand nombre d'espèces bactériennes. La lecture est faite par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle.

La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition (Ponse, 2003) :

- $\emptyset < 8$ mm : bactéries non sensibles (-) ;
- $9 < \emptyset < 14$ mm : bactéries sensible (+) ;
- $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible (++) ;
- $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible (+++).

Cinq différentes concentrations d'extrait (100, 50, 25, 6.25, 3.125 mg/ml) ont été testées sur les souches. Le DMSO est utilisé comme témoin négatif. Après 24 h d'incubation à 27°C pour les *Pseudomonas*, et 37°C pour les *Streptococcus*, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition présentés la figure 10.



(a)



(b)

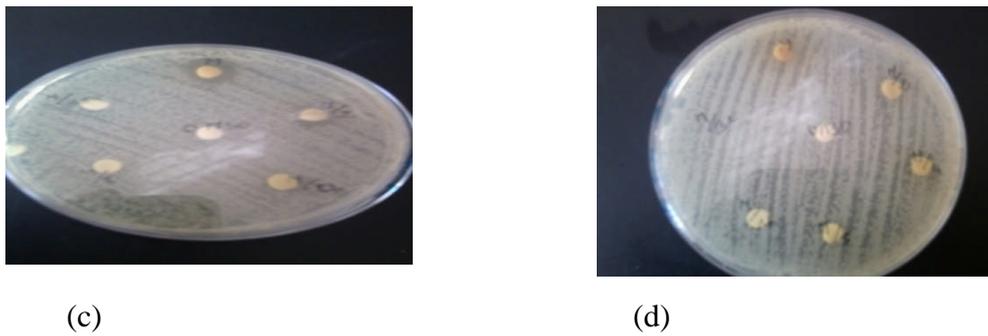


Figure 10: Photos des zones d’inhibition exercée par les polyphénols d’*Oléastre* sur les souches.

(a) : *Pseudomonas aeruginosa*, (b) : *Pseudomonas sp*,
 (c) : *Streptococcus pyogenes*, (d) : *Streptococcus Sp*.

Les résultats montrent que DMSO n’exerce aucun effet antibactérien sur les souches étudiées, ce qui affirme que le pouvoir antibactérien est exercé par l’extrait phénolique.

Les résultats de l’activité antibactérienne des composés phénoliques des feuilles d’*Oléastre* ont permis de classer les souches (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas sp* et *Streptococcus pyogene* ATCC CECT, *Streptococcus sp*) selon leur degré de sensibilité. Nous avons remarqué que l’extrait exerce un effet sur les bactéries Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas sp*) que sur les bactéries Gram positif (*Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus sp*).

Les zones d’inhibition obtenues après 24 h d’incubation sont représentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : les diamètres des zones d’inhibition remarqués après l’incubation.

[] mg/ml	100	50	25	6.25	3.125	DMSO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 mm	9 mm	7 mm	—	—	—
<i>Pseudomonas sp</i>	12 mm	11 mm	7 mm	—	—	—
<i>Streptococcus pyogenosa</i>	8 mm	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus sp</i>	—	—	—	—	—	—

(--): absence de zone.

Le diamètre des disques est inclus.

(--): absence de zone.

Les diamètres des zones enregistrés varient selon la souche et la concentration de l'extrait. Des zones d'inhibition de faibles diamètres (<9mm) ont été observées pour les boites ensemencées avec *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT. L'extrait polyphénolique ne manifeste aucune activité inhibitrice vis-à-vis *Streptococcus sp.*

Des diamètres moyens ont été enregistrés avec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas sp.* Ces souches se sont révélées sensibles aux extraits testés. Nos résultats sont en accord avec les observations de **Ben abbes (2011)**, qui s'est intéressé à la mise en évidence d'activités biologiques dans les extraits de dattes qui a révélé une résistance de certaines souches bactériennes et paradoxalement une forte sensibilité d'autres souches en occurrence *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 10 mm à partir des concentrations de 300 µg/ml.

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ces agents pathogènes n'est pas bien connu, les études exploitées par **Domineco et al (2005)** ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physicochimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien., Et Les travaux rapportés par **Shan et al ., (2007)** ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux agents antibactériens. la membrane des bactéries à Gram positif peut être traversée facilement par les polyphénols qui peuvent atteindre leurs sites d'action.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par **Katarzyna et al (2007)** qui ont démontré que de nombreux composés flavoniques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif, et Gram positif.

Tandis que nous résultats sont en accorde avec ceux obtenus par **Sudhakar et al.(2006)**, qui ont observé un pouvoir antibactérien des extraits de deux plantes médicinales *Cleome viscosa* et *Gmelina asiatica* sur *E. coli* que sur *S. aureus* ou *B. Subtilis* (donc ces extraits exercent un pouvoir antibactérien sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif).

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes, peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles

présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (Dhaouadi *et al.*, 2010).

De plus, l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000). Ainsi que selon certains auteurs, les molécules polyphénoliques comme l'oleuropéine pourraient s'hydrolyser, ce qui provoque une baisse dans l'activité antimicrobienne (Brainte *et al.*, 2000).

3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI diffère d'une espèce végétale à une autre et d'une bactérie à une autre (Penalver *et al.*, 2005). La classification de l'efficacité du matériel végétal sur la base des CMI telle qu'elle est proposée par Aligiannis *et al.* (2001) (cité par Fabri *et al.* (2009) est la suivante :

- Forte inhibition: CMI inférieure à 500 µg/ml;
- Inhibition modérée: CMI varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml;
- Faible inhibition: CMI supérieure à 1600 µg/ml.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant

Tableau IX : Les résultats de la CMI et de CMB des quatre souches.

Souches	CMIS (mg/ml)	(CMB mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	12.5
<i>Pseudomonas sp</i>	11	12.5
<i>Streptococcus pyogene</i> ATCC CECT	18	25
<i>Streptococcus sp</i>	20	25

Les résultats de la CMI révèlent que notre extrait n'exerce pas d'effet antibactérien important sur les souches étudiées.

Notre résultat est en record avec ceux de **Sudjana et ses collaborateurs (2009)** qu'a testé un extrait aqueux de feuilles d'olivier contre 122 espèces microbiennes. Ils ont constaté que cet extrait a exercé un effet antimicrobien trop restreint, car, parmi l'ensemble des microorganismes testés, uniquement *C. jejuni*, *Helicobacter pylori* et *S. aureus* ont manifesté une certaine sensibilité envers cet extrait. Les valeurs de CMI enregistrées étaient comprises entre 0,31-0,78 % (v/v) pour ces 03 souches bactériennes. Cependant, pour le reste des microorganismes, entre autres *P. aeruginosa*, leurs CMI sont situées entre 6,25 et 50 % (v/v)

4. Sensibilité des souches bactérienne aux divers antibiotiques

4.1 Les antibiotiques en disques

Les souches de bactéries Gram + (*Streptococcus pyogenes* ATCC CECT et *Streptococcus sp*) et Gram- (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas sp*) ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques testés : Kanamycine 30 ; Neomycin 30 ; Ampicilline 10 ; bioanalyse. Les diamètres observés après incubation sont présentées dans **le tableau X**.

Tableau X : Les résultats de sensibilité des souches envers les antibiotiques (en disques).

Famille d'antibiotique				
Bactéries	K30	N30	AM10	SXT25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29 mm	28 mm	—	—
<i>Pseudomonas sp</i>	27 mm	25 mm	—	—
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25 mm	24 mm	—	19 mm
<i>Streptococcus sp</i>	30 mm	29 mm	—	—

K30 : Kanamycine 30 ; N30: Neomycin 30 ; AM10: Ampicilline 10 ; SXT25: bioanalyse 25 ; (--) : absence de zone.

Le diamètre du disque est inclus.

La **figure 11** présente les photos prises pour les zones d'inhibition des souches vis-à-vis les antibiotiques en disques.

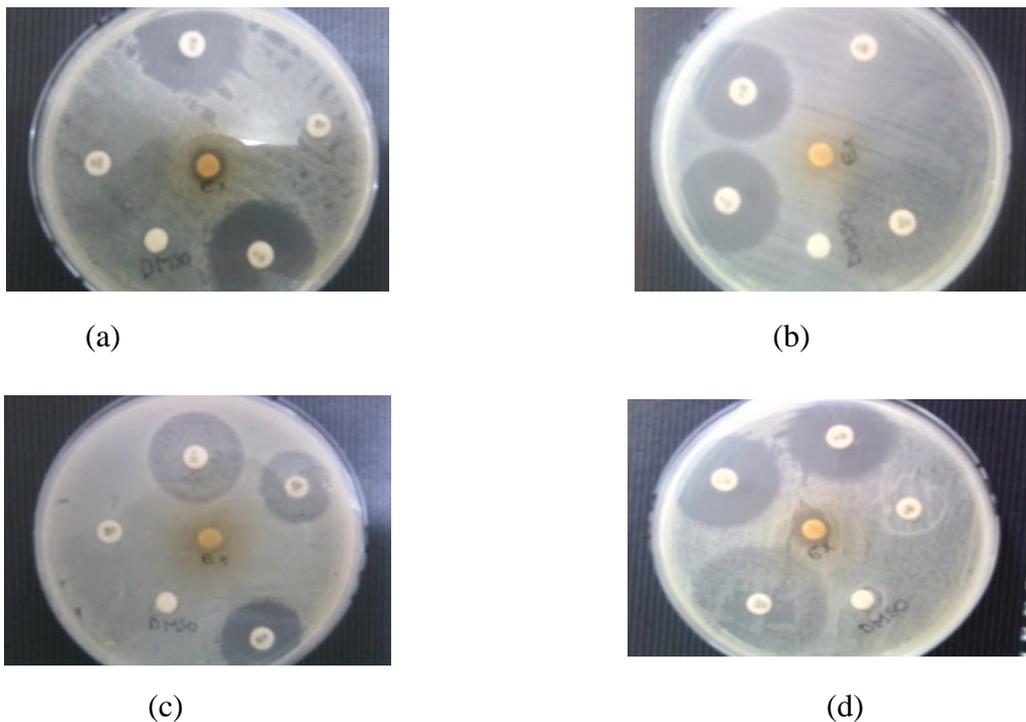


Figure 11: les photos correspondent aux résultats de tests d'antibiotiques en disques.

(a) : *Pseudomonas aeruginosa*, (b) : *Pseudomonas sp*,
(c) : *Streptococcus pyogenes*, (d) : *Streptococcus sp*.

Toutes les souches étudiées s'avèrent résistantes à l'AM 10 ce résultat est similaire à celui trouvé par **Ouali et Souci (2014)** qui ont étudié l'effet du même antibiotique sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas sp*. Le même lien est noté par **Benbabbes (2011)** qui a observé une résistance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 vis-à-vis l'ampicilline (6.33mm). Et alors que les *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas sp* et *streptococcus sp* développent une résistance vis-à-vis l'antibiotique SXT 25 et seule *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT est sensible à cet antibiotique. Tandis que les quatre souches se sont avérées sensibles aux l'antibiotiques N 30 et K 30.

4.2 Les antibiotiques en solution

Les résultats de sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques liquide ainsi que les différentes combinaisons entre ces derniers et l'extrait, et les antibiotiques entre eux sont présentés dans le **tableau XI**.

Tableau XI : résultats de sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques en solution

	A	A+Ext	B	B+Ext	C	C+Ext	D	D+Ext	A+D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—	—	9 mm	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas sp</i>	23mm	15mm	—	—	—	—	—	—	16 mm
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC CECT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus sp</i>	10 mm	8 mm	—	7 mm	—	—	—	—	9 mm

A : cefatoxine ; B : cefazoline ; C : ampicilin ; D : amoxy ; (--) : absence de zone.

Le diamètre des disques est inclus.

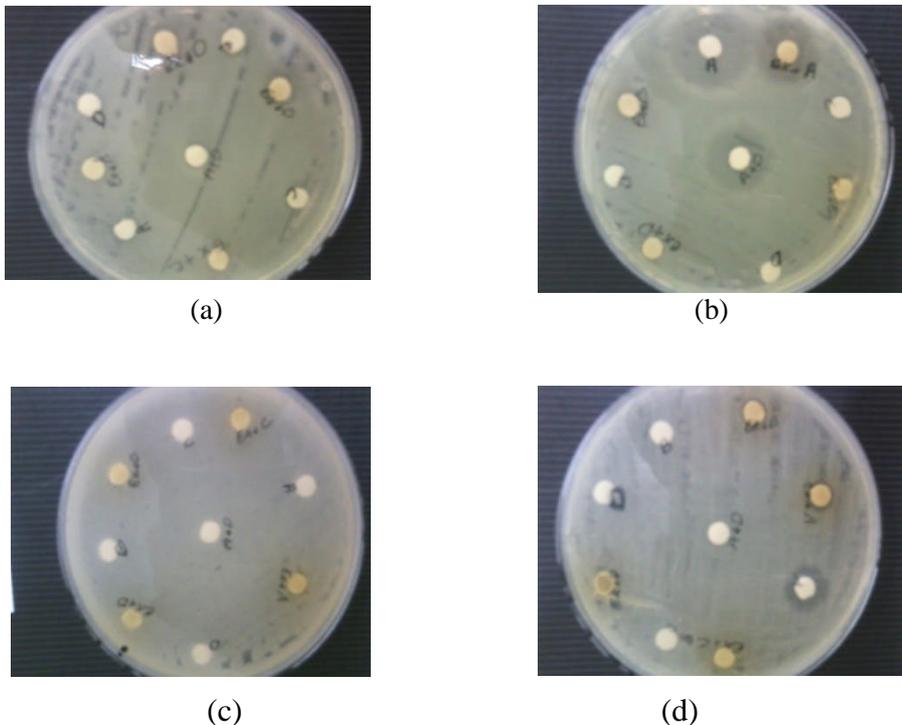


Figure 12 : les photos des zones marquées par les antibiotiques en solution.

(a) : *Pseudomonas aeruginosa*, (b) : *Pseudomonas sp*,
(c) : *Streptococcus pyogenes*, (d) : *Streptococcus sp*.

Nous constatons que *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT présente une résistance à tous les antibiotiques ainsi qu'à toutes les combinaisons. Tandis que *Pseudomonas sp* est sensible uniquement à la cefatoxine, à la combinaison de cefatoxine - Amoxicilline et cefatoxine – extrait phénolique. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est résistante à tous

les antibiotiques sauf à la combinaison (cefazoline + Extrait). *Streptococcus sp* présente une sensibilité à la cefatoxine, cefatoxine + Ext, et cefatoxine + amoxy.

III. Effet de l'extrait phénolique des feuilles d'Oléastre sur la croissance bactérienne en fonction des paramètres physico-chimiques.

Les résultats du plan factoriel ont été obtenus par démembrement des colonies, après incubation pendant 24h .

L'exploitation des résultats du dénombrement ont dévoilé les combinaisons idéales pour ralentir la croissance des bactéries psychrotrophes à savoir :

Un pH de 5, une [NaCl] de 4, et une concentration de 100 mg/ml d'extrait brut, pour *Streptococcus pyogenes* à 4°C ou à 37°C.

Un pH de 5, une [NaCl] de 5, et une concentration de 100 mg/ml d'extrait brut, pour la souche de *Streptococcus sp* à 4°C ou 37°:

Un pH de 7.63, une [NaCl] de 6, et une concentration de 100 mg/ml d'extrait brut *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 à 4 °C. Un pH de 6, une [NaCl] de 8, et une concentration de 100 mg/ml à 27°C. :

Pour *Pseudomonas sp* : un pH de 8 une [NaCl] de 1g/l, une concentration de 100 mg/ml d'extrait brut à 4°C. Un pH de 5, [NaCl] de 8 et une concentration de 100 mg/ml d'extrait brut à 27°C. . Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Keskin et Ekmekçi (2008)** qui ont fait une étude sur l'influence du pH sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et ils ont rapporté qu'un pH de 5 exerce un effet bactéricide sur la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Grace à l'analyse de ces résultats, nous avons pu déterminer la concentration de 100 mg/ml d'extrait brut comme étant la concentration la plus efficace sur la réduction de la croissance des bactéries psychrotrophes que ce soit à 4°C ou à (27/37°C), le pH de 5 à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 comme le pH inhibiteur.



Conclusion

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté aux plantes comme source de substances bioactives. Elles sont Utilisées dans le domaine alimentaire pour la conservation des produits des différentes altérations.

Les produits de la pêche sont des denrées alimentaires bien connues pour leur apport nutritionnel, notamment en protéines d'excellente qualité; mais aussi pour leur fragilité et leur rapidité d'altération sitôt après la capture. Même conservés au froid, les produits de la pêche sont exposés aux altérations causées par des bactéries psychrotrophes.

Notre travail avait pour objectif le suivi de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT, *Pseudomonas sp*, et *streptococcus sp* isolées à partir de l'Espadon congelé en fonction des paramètres physicochimiques et l'extrait phénolique des feuilles d'*Oléastre*. Les résultats obtenus indiquent la sensibilité des quatre souches étudiées aux extraits polyphénoliques des feuilles d'*Oléastre* avec une forte sensibilité notée vis-à vis de *Pseudomonas*. La concentration minimale d'inhibition enregistrée pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est de 10 mg/ml, et 11 mg/ml pour *Pseudomonas sp*, *Streptococcus pyogenes* ATCC CECT à présenter 18 mg/ml, enfin *Streptococcus Sp* 20mg/ml.

L'étude de l'influence de la concentration de l'extrait sur les souches a révélé une réponse dose dépendante. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient de 8-12 mm pour la concentration de 100 mg/ml et inférieure à 7mm pour la concentration 25 mg/ml.

Les études de l'influence des paramètres physicochimique (pH, NaCl, température) *in vitro*, ont montré que :

La température favorisant la croissance des souches *Pseudomonas* est de 27°C et celle de *Streptococcus* est de 37°C. Tandis qu'à basse température (4°C), la croissance des deux bactéries est sensiblement réduite.

A pH de 5 la croissance des souches est réduite, alors qu'à pH de 7,63 et 8 le développement est plus élevé.

Les variations de NaCl (gamme allant de 1g à 8g) n'exercent pas d'effet inhibiteur sur la croissance des souches.

Le plan factoriel qui consiste en la combinaison des différents paramètres montre bien l'interaction existant entre eux réunis, ils peuvent favoriser la croissance bactérienne ou au contraire l'inhiber. Les meilleures inhibitions sont obtenues avec les combinaisons suivantes :

Streptococcus pyogenes : pH de 5, NaCl=4g/l, 100mg/ml d'extrait brut et à 4°C.

Streptococcus sp : pH de 5, NaCl=5g/l, 100mg/ml d'extrait brut et à 4°C.

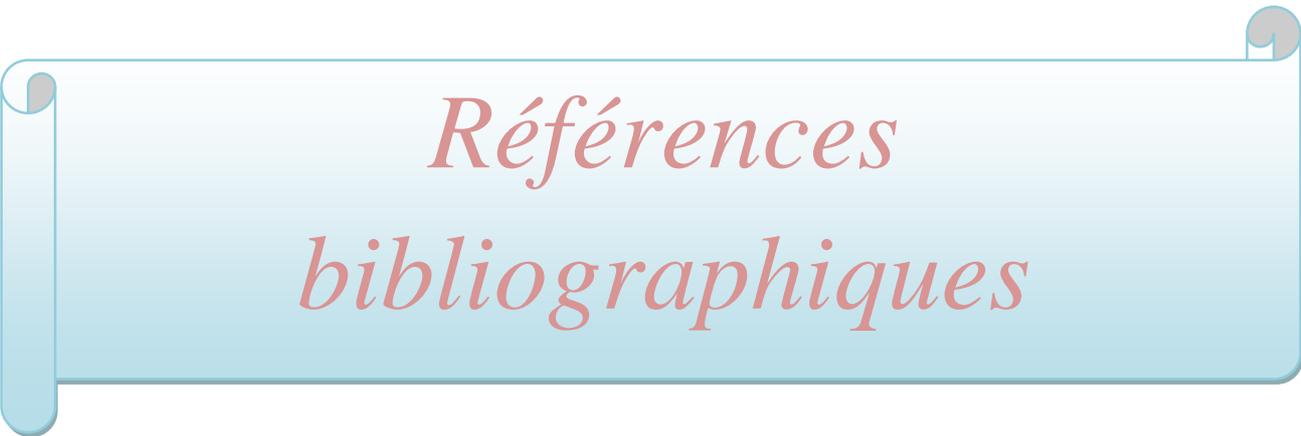
Pseudomonas aeruginosa : pH de 7.63, NaCl =6g/l, 100mg/ml d'extrait brut et à 4°C.

Pseudomonas sp : pH de 5, NaCl=1g/l, 100mg/ml d'extrait brut et à température 4°C.

Ce présent travail montre bien que l'utilisation de l'extrait polyphénolique de l'*Oléastre* avec la conservation à basse température permet de réduire significativement la prolifération des *Pseudomonas* et *Streptococcus*. Ces résultats pourraient être exploités dans le domaine alimentaire pour la conservation des produits de la pêche.

D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- ✓ Tester l'activité de l'extrait sur des matrices alimentaires ;
- ✓ Effectuer l'étude sur d'autres souches ;
- ✓ Evaluer d'autres activités comme : antidiabétiques, antimicrobiennes, anticancéreuses ... et autres de l'extrait de l'*Oléastre* ;
- ✓ Etudier d'autres paramètres physico-chimiques.



*Références
bibliographiques*

- Abdel-Megeed, A. (2004).** *Psychrophilic degradation of long chain alkanes*. Dissertation Technische Universität Hamburg-Harburg.
- André., (2008).** Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms, 524-200.
- Anghileri L.J. And Thouvenot P. (2000).** Naturel polyphenols-irons interaction its biological importance. *Biol. Trace Elem. Res.*, 73, 251-258.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J-Y., Wakabayashi, H. And Oyaizu, H.(2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563–1589.
- Apak R.,Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoglu B., Berker K.I. And Özyurt D. (2007).** Comparative evolution of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Beales, N. (2004).** Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1-20.
- Ben Abbes F., (2011) Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenix dactylifera L. ». Thèse de magister université de Ferhet Abbes: 63p.**
- Begum A.N., Nicolle C., Milla I., Lapierre C., Nagano K, Fukushima K, Heinonen S.M., Adlercreutz H., Remesy C. And Scalbert A. (2004).** Dietary lignins are presursors of mammalian lignans in rats . *J. Nutr.*, 134, 120-127
- Bendini A., L. Cerretani, S Vecchi, A. Carrasco-Pancorbo, G. Lercker., (2006).** Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4880-4887.
- Bianco A., Uccella N., (2000).**Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33, 475-485.
- Bisignano G., Tomaino A ., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A., (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51. pp. 971-4.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. & Zucca J., (1996).** *Microbiologie Alimentaire .Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.* Londre, Paris.
- Breton Catherine, Pinatel Christian, Médail Frédéric, Bonhomme François, Berville**
- Campbell, B. M., & Luckert, M., (2002) (Eds.).** *Uncovering the hidden harvest: Valuation methods for woodland and forest resources.* London: Earthscan.

- Brainte R, Francesco LC, Ferdinando F, Maurizio P et Roberto N. (2000).** Hydrolysis of Oleuropein by recombinant b-glycosidases from hyper thermophilic *Archea sulfolobus* immobilised on chitosan matrix. *J. Biotechnol.* Vol. 71. pp. 275-286.
- Catteau M.(1999)** : Pathogènes rencontrés lors de la conservation par le froid. *In* : La microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D., & Sowers, K. R. (2002).** Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 253-261
- Cheftel J., (1976).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Ed.Tech. Et doc, Paris.*
- Chéret R., (2005).** Effet des hausses pression sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Thèse de doctorat. Université de Nantes : 176p.
- Clifford M. N (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates – Nature. Occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J.Sci. Food Agri.*, 80(7), 1033-1043.
- Cowan, M.M (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agent. *Clin. Microbiol Res.*, 12 (4) : 564-582.
- D'amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., & Gerday, C. (2006).** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*, 7(4), 385-389.
- Derbel S, Ghedira K.(2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition* numéro 1; 28-34.
- Dicko M.H., Gruppen H., Traore A.S., Voragen A.G And Van Berkel W.J.H. (2006).** Phenolic compounds and relation enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnol. Mol. Biol. Re.*, 1(1), 21-38.
- Djenane, Yangüela, Derriche, Bouarab, and Roncales (2012).** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde, 54-60.
- Doveri S., Baldoni L., (2007).** Olive in Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Ed C. Kole. Volume 4: Fruits and Nuts, 253- 264.
- Dunajsky E., (1979).** Texture of fish. *Journal of Texture Studies*, 10 , 301-318.
- ESSAWI T. AND SROUR M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*; 70: 343-349.

- Eymard S., (2003).** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*): choix des procédés. Thèse de doctorat. Université de Nantes : 217 p.
- Feller, G., & Gerday, C. (2003).** Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 200-208.
- Ferreira I.C.F.R., Barros L., Soares M.E, Bastos M.L . And Pereira J.A. (2007).** Antioxidant activity and phenolic contents of *olea europaea* L. Leaves sprayed with different copper formulation. *Food chem.*, 103,188-195.
- Food and Agriculture Organization., (2003).** Assurance de la qualité dans les produits de mer. Italie . Rome 95p.
- FAO. (2010).** *La Situation Mondiale Des Pêches Et De L'aquaculture*. Rome: FAO.
<http://www.fao.org/docrep/013/i1820f/i1820f.pdf>. 2012. *La Situation Mondiale Des Pêches Et De L'aquaculture*. Rome: FAO.
<http://www.fao.org/docrep/016/i2727f/i2727f.pdf>
- Fournaud J.(1982)** : Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière. *In* : Hygiène et technologie de la viande fraîche, 353 pages, Centre national de la recherche scientifique Editeur, Paris.
- Fraga Cesar G, Oteiza Patricia I. (2011).** Dietary flavonoids: Role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 813–823.
- Gazzah Mohamed, Bervillé André., (2008).**Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia, *Scientia Horticulturae* 116, 280–290.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.-P., Claverie, P., Collins, T.,D 'Ami Co, S.,Dumont ,J., Garsoux, G., Georle Tte,D., Ho Youx ,A., Lonhienne, T., Meuwis, M.-A., & Feller, G. (2000).** Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(3), 103-107.
- Gounot, A. M. (1986).** Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 42(11), 1192-1197.
- Gounot, A.-M. (1991).** Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Microbiology*, 71(5), 386-397.
- Ghanbari Rahele, Farooq Anwar, Alkharfy Khalid M, Gilani Anwarul-Hassan and Saari Nazamid.,(2012).** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3291-3340.
- Ghedira K., (2008)** - L'olivier. *Phytothérapie*. 6, ; 83-89.

Guiraud J.P., (1998). Microbiologie alimentaire, Dunod, Paris.

Gunde-Cimerman, N., Butinar, L., Sonjak, S., Tur K, Ursic, V., Zalar, P., & Plemenitas A. (2005). Halotolerant and Halophilic Fungi from Coastal Environments in the Arctics. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren & A. Plemenitaš (Ed) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, vol. 9 (pp. 397-423): Springer Netherlands.

HANDIQUE J.G and BARUAH J.B (2002). Polyphenolic compounds : an overview. *React. Funct. Polym.*, 52,193-188.

Hannachi Hédia, Breton Catherine, Msallem Monji, Salem Ben El Hadj Salem Ben, El Huang, C.L.; Sumpio, B.E.,(2010). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg.* 207, 407–416.

Hatfield R. and Vermerris W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physio.*, 126, 1351-1357.

Hughes R. B & Jones N. R., (1996). Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with comment on flavour relation. *J.Sea. Food Agree*, 17, 434-436.

Huss H.H., (1999). Qualité et son évolution dans le poisson frais. Laboratoire de technologie Ministère de l’agriculture et des pêches Danemark. In F.A.O. Document Technique sur les pêches – 348 FAO. L’organisation des nations unies pour L’alimentation et L’agriculture : 17, 213-334.

Huston, A. L. (2008). Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes In R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx & C. Gerday (Eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, (pp. 347-363): Springer Berlin Heidelberg.

Japón-Luján R, Luque-Rodríguez J et Luque de Castro M., (2006). Dynamic ultrasound assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr A*. Vol. 1108. pp. 76–82.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*: Springer Verlag.

Junge, K., Christner, B., & Staley, J. T. (2011). Diversity of Psychrophilic Bacteria from Sea Ice - and Glacial Ice Communities. In K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles Handbook*, (pp. 793-815): Springer Japan.

Keskin.D., Ekmekçi.S.,(2008). Investigation of The Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in Foods and The effect of salt and pH on *P. aeruginosa*,41-45 p.

- Kodo J.L . (1990).** L'ionisation des produits de la pêche. Collection «valorisation des produits de la mer». Ifremer, France., 15 p.
- Kolodzieska I., (1995).** Enterglobalenter departement of food preservation, technical university of Gdansk, Katedra Technologiii Utrwalania Zywnosci, Wydzial chemiczny, Politechnika, Ul. G.n Narutowicza, Gdank-Wreszcz, Poland, **8** ,80-952 p.
- Larpent J.-P.(1995) :** *Listeria*, 140 pages, Lavoisier Editeur, Paris.
- Lavee Shimon.,(2013).** Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*, Volume 161, 333–339.
- Leveau , J. Y., Larpent , J. P., & Bouix , M. (2001).** Sécurité microbiologique des procédés alimentaires. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés*(F1120), F1120 1121 – F1120 1119.
- Margesin, R. (2008).** *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*: Springer Verlag.
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011).** Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346-361.
- Mayo, B., Derzelle, S., Fernandez, M., Leonard, C., Ferain, T., Hols, P., Suarez, J. E. And Delcour, J. (1997).** Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 179, 3039-3042.
- Morita R.Y., (1975).** Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev*, **39**, 144-167.
- Oumansour Y .F., (2001).** Étude de l'altération des huiles du poisson après décongélation .effets micro-ondes. Diplôme de Magister. Université de M'hammed Bouguerra Boumerdes, 95p.
- Owen R- W., Haubner R., Wurtele G., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H., (2004)** Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 13, 319-326.
- Palleroni, N.J.(2008).** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- Papadopoulou A. and Frazier R.A. (2004).** Chracterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 186-190.
- Pelli K. & Lyly M.,(2003).** Les antioxydants dans l'alimentation, consommateurs n°3. *VTT biotechnologie*, Finlande. ISBN 2-7380-1069-5 : 28p.
- Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B and Aydogan C., (2008).** Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*, 22, 1239 - 1242.

- Polzonetti V., Egidi D., Vita A., et al.,**(2004). Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*. 88, 1-15.
- Renner M.,** (2000). Station de recherche sur la viande, INRA 63122 St Gènes-champagnelle, in *Antioxydants in Muscle Foods*, John Wiley , New-York., 113p.
- ROUPE K.A., REMSBERG C.M., YANEZ J.A. and DAVIES N.M.**(2006). Pharmacometrics of stilbenes : sequencing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.*, 1,81-101.
- Salas J- L., Sanchez J., Ramli U- S., Manaf A- M., Williams M., Harwood J- L.,** (2000). Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progr. Lipid Res.*,39p .
- Samuel A., Boyer J., Carbonneau M-E., Coulombe F., Coulombe N., Desbiens M., Leclerc L., Martin C. & Morin R.,** (2002). Guide Elevage des Salmonidés, Fascicule 12, Transformation. Ministère de l'agriculture Québec, des pêcheries et de l'alimentation, *ISBN.*, 133p.
- Scherer, S., & Neuhaus, K.** (2006). Life at low temperatures. In *The prokaryotes*, vol. 2 (pp. 210-262).
- Serror, P., Dervyn, R., Ehrlich, S. D. And Maguin, E.** (2003). csp-like genes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and their response to cold shock. *FEMS Microbiology Letters* 226, 323-330.
- Shewan J.M.,** (1977). the bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In : *Proceeding of the conference on Handling, Processing and Marketing of tropical Fish.*, Tropical Product Institute, London., 51-66.
- Stoclet J.-C., Schini-Kerth V.** (2011). Dietary flavonoids and human health. *Annales Pharmaceutiques Françaises* Volume 69; 78–90.
- Sudjana AN., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley TV et Hammer KA.,** (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. I. *J. Antimicrob. Agents*. Vol. 33. pp. 461-463.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N.** (2001). Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(2), 144-148.
- Terral JF., Arnold- Simard G**(1996). Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res.* 46, 176-85.
- Thomas, D. N., & Dieckmann, G. S.** (2002). Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. *Science*, 295(5555), 641-644.

- Van Stempvoort, D., & Biggar, K. (2008).** Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review. *Cold Regions Science and Technology*, 53(1), 16-41.
- Visioli F., Galli C.,(2002).** Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 42, 209-210.
- Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z, Madar Z.,(2013).** Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*, 01-477.
- Williamson G. and Manach C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 24S-255S.
- Wouters, J. A., Jeynov, B., Rombouts, F. M., De Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999a).** Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology* 145, 3185-3194.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., De Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999b).** Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4436-4442.
- Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R. And Chen S.S (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, 59 :113-122.



Annexes

Annexe I :

Matériels, réactifs et milieux de cultures utilisés.

I.1.Appareillage

- Autoclave (Webeco, Allemagne);
- Bain- marie (Memmert, Allemagne);
- Etuve réglée à 27°C (Nuve, Turke) et 37°C (Brinder, Allemagne);
- Bec bunsen ;
- Balance (Kern, Allemagne);
- Balance de précision (Kern, Allemagne);
- Réfrigérateur à 4°C (ENIEM, Algerie);
- Compteur de colonies (Selecta, Espagne);
- Broyeur (Stomacher) (D 56 model France);
- Spectrophotomètre (Medline, Royaume uni);
- pH-mètre (Inolab, Allemagne);
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante (Labinko, Allemagne).

I.2. Autres matériels

- Boîtes de pétri;
- Micropipettes automatique de 10µl-100µl-1000µl ;
- Embouts stériles;
- Cuves;
- Portoirs;
- Tige magnétiques;
- Barreaux aimantés ;
- Tube éppendorf ;
- Filtres de membrane ;
- Papier wattman n1°.

I.3.Milieux de culture

- Gélose nutritive (GN)
- Gélose standard avec glucose (PCA: Plant Count Agar)
- Gélose Cétrimide
- Gélose Mueller –Hinton
- BEA

I.4.Produits et réactifs

- Ethanol 70% ;
- Eau physiologique stérile à 0.09 %
- Eau distillée ;
- Eau de javel ;

Annexe II :

Composition chimique des solutions et principaux milieux de culture utilisés

➤ Milieux liquides

- **Eau physiologique stérile**

- Chlorure de sodium (NaCl)..... 9g
- Eau distillée..... 1L
- Ph=7
- Stérilisation à 120°C /20min

- **Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)**

Protéose-peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g

Phosphate disodique..... 5g

Glucose..... 2g

Eau distillée..... 1L

PH : 7,4

Stérilisation à 120°C/ 20min.

➤ **Milieux solides**

• **Gélose Muller Hinton (MH)**

Extrait de viande..... 3g

Hydrolysate acide de caséine..... 17.5g

Amidon..... 1.5g

Agar..... 16g

Eau distillée..... 1L

Ph=7.3

Stérilisation à 120°C/20 min.

• **Gélose Nutritive (GN)**

Peptone..... 10g

Extrait de viande..... 3g

Extrait de levure..... 3g

Chlorure de sodium..... 5g

Agar..... 18g

Eau distillée..... 1L

Ph=7.2±0.2

Stérilisation à 120°C/20min.

- **Gélose PCA**

Tryptone.....	5g
Extrait de levure.....	2.5g
Glucose.....	1g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1L

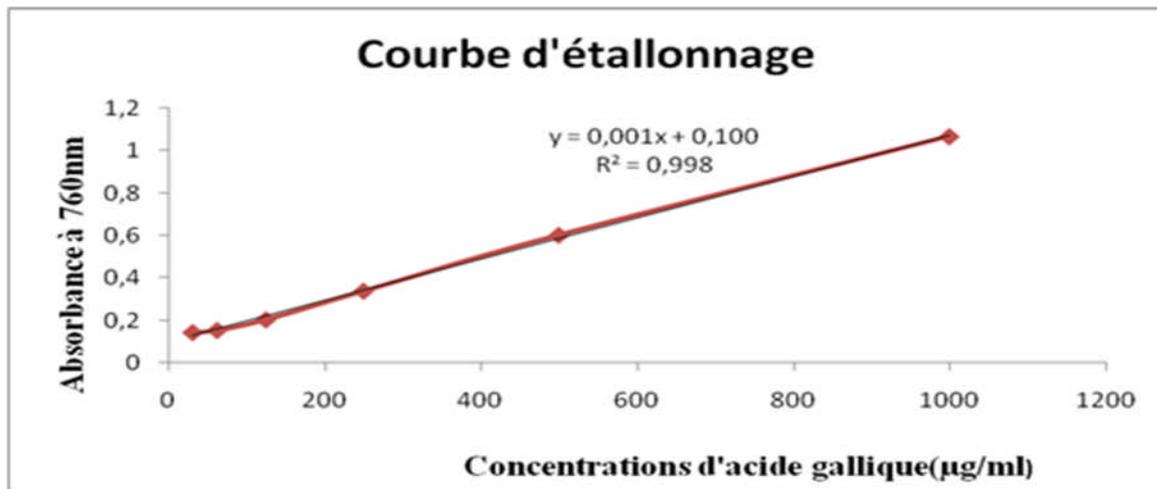
Ph=7±0.2

Stérilisation à 120°C/15min.

- **Gélose au Cétrimide**

Peptone de gélatine.....	16g
Peptone de caséine.....	10g
Bromure de tétradonium (cétrimide).....	0.2g
Acide nalidixique.....	15mg
Sulfate de potassium.....	10g
Chlorure de magnésium.....	1.4g
Agar.....	10g

Ph=7.1



Annexe III : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux