



DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

M^{elle} Remaci Djahida

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité : CONTROLE DE LA QUALITE DES ALIMENTS.

THÈME

Effets antimicrobiens de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* (Thym) récolté dans la région de Naama sur la croissance des germes lactiques : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Soutenu publiquement le 04/Juillet/2017.

DEVANT LE JURY

Président :	M. BOUDEROUA.K	Professeur	Université de Mostaganem.
Encadreur :	M. AIT SAADA. D	M.C.B	Université de Mostaganem.
Examineur :	M. BENMILOUD	M.A	Université de Mostaganem.
Invité :	M.HAROUN. K	Doctorant	Université de Mostaganem.

Le thème est réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie et le laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition - Université de Mostaganem -

Année universitaire : 2016 – 2017.

Liste des abréviations

UFC : Unité formant colonie.

OMS : Organisation mondiale de standardisation.

CMI : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice.

CMB : Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.

ml : Millilitre.

ED : Eau distillée stérile.

mm : Millimètre.

BN : Bouillon nutritif.

°D : Degré Dornic.

C° : Degré Celsius.

g : Gramme.

h : Heure.

p : Seuil de probabilité.

T° : Température.

% : Pourcentage.

Liste des Figures

- Figure N°01.** Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L. (Iserin ; 2001).....
- FigureN°02.** Schéma illustrant les interactions de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut et al ; 2000).....
- Figure N°03.** Etape d'extraction des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* selon le protocole de (Sultana et al ; 2009).....
- Figure N°04.**Préparation des différentes solutions expérimentales.....
- Figure N°05.** L'étape de l'activation de souche bactérienne.....
- Figure N° 06.** Méthode de contact direct.....
- Figure N° 07.** Méthode des disques par diffusion sur gélose.....
- Figure N°08.** Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait *Thymus vulgaris* chez *Lactobacillus bulgaricus*.....
- Figure N°09.** Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait *Thymus vulgaris* sur le *Streptococcus thermophilus*.....

Liste des tableaux

- Tableau N° 01.** Classification botanique de *Thymus vulgaris* (Morales ; 2002).....
- Tableau N° 02.** Effet des différentes dilutions d'extrait au l'hexane de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.....
- Tableau N°03.** Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus*.....
- Tableau N°04.** Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez le *Lactobacillus bulgaricus*.....
- Tableau N°05.** Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.....
- Tableau N°06.** Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.....
- Tableau N°07.** Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.....
- Tableau N°08.** Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.....
- Tableau N°09.** Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.....
- Tableau N°10.** Action inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*).....

SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations.....	01
Liste des tableaux.....	02
Liste des figures.....	03
Introduction.....	04
Partie 1: Etude bibliographique	
Chapitre I : <i>Le Thymus vulgaris</i>	05
1-Historique.....	05
2- Origine et distribution de la plante.....	05
3- Place dans la systématique.....	05
4- Les caractéristiques de la plante.....	06
4- 1 Description.....	06
4- 2 Culture extérieure.....	07
4- 3 Récolte.....	07
4-4- Séchage.....	07
4- 5 Conservation.....	07
4- 6 Principes actifs du thym.....	08
5- Propriétés et emplois.....	08
5-1 Propriété générale.....	08
5- 2 L'utilisation des feuilles de <i>Thymus vulgaris</i>	08

Chapitre II : Les bactéries caractéristiques du yaourt.....10

1- Caractéristiques générales des bactéries spécifiques du yaourt	
1-1 <i>Streptococcus Thermophilus</i>	10
1-2 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10
2-Intérêts et fonctions des bactéries du yaourt.....	11
2-1 Production d'acide lactique.....	11
2-2 Activité protéolytique.....	11
2-3 Activité aromatique.....	12
2-4 Activité texturante	12
3- Comportement associatif des deux souches.....	13

Partie 1 : Méthodologie expérimentale

1- Objectifs.....	15
2- Zone de prélèvement de l'espèce végétale <i>Thymus vulgaris</i>	15
3- Préparation de l'échantillon.....	15
4-Extraction des composés bioactifs.....	15
4- Préparation des différentes solutions expérimentales.....	16
5- Etude des effets antimicrobiens des extraits de thym.....	17
5-1 Activation des souches microbiennes expérimentales.....	17
5-2 Méthode de contact direct.....	18
5-3 Méthode des disques par diffusion sur gélose.....	20
5-4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	22
5-5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	23
6-Traitement statistique.....	23

Partie 3 : Résultat es discussion

1- Résultats.....	24
1-1 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	24
1-1-1 Méthode de contact direct.....	24
1-1-2 Diamètre d'inhibition.....	25
1-1-3 Taux d'inhibition.....	26
1-1-4 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	27
1-1-5 Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	27
1-2 <i>Streptococcus thermophilus</i>	28
1-2-1 Méthode de contact direct.....	28
1-2-2 Diamètre d'inhibition.....	29
1-2-3 Taux d'inhibition.....	30
1-2-4 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	31
1-2-5 Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	32
1-3 Rapport CMB/CMI.....	33
2- Discussion des résultats.....	34
Conclusion.....	36

Référence bibliographique

Annexes

Introduction

Les propriétés antimicrobiennes des composés bioactifs des plantes aromatiques et médicinales ont été reconnues depuis longtemps, mais n'ont été confirmées scientifiquement qu'avec l'évolution des moyens techniques et analytiques. Parmi ces plantes le thym semble posséder des atouts considérables grâce à la découverte progressive de leurs larges applications dans les soins et beauté, ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêts économiques selon l'OMS (**Walter et al ;2004**).

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors des congrès scientifiques d'aromathérapie (**Bousibia ; 2004**). Il résulte que les extraits phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques. Selon les travaux de (**Freeman et al., 2006**), ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques.

Ces effets antibactériens nous ont conduit à poser la question suivante : « Est-ce que l'utilisation des extraits de thym comme adjuvant dans les produits laitiers (production de yaourt par exemple) peuvent avoir un effet sur la croissance des ferments lactiques tels, que les *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* qui présentent des intérêts variés (Industriel et nutritionnel)» ?

Nous nous sommes proposé donc dans cette étude de suivre le comportement *in vitro* de ces deux souches de levains lactiques spécifiques du yaourt vis-à-vis des inhibiteurs de croissance (ou composés bioactifs) du thym extraits par la méthode de macération de la matière végétale de la plante dans une solution aqueuse d'hexane.

1-Historique :

Thymus vient du grec thumo qui signifie «je parfume». Connue depuis la haute antiquité, les égyptiens l'utilisaient pour embaumer le corps. Théophraste, au 4^{ème} siècle avant J.C a cité les deux espèces sauvages serpolet et vulgaire, qu'il appelle les thymus blanc et noir.

Aetius, général Romain fin 4^{ème} siècle ; parle déjà de poudre de thym utilisée pour les gouteux, les douleurs de reins et de la vessie.

Chamberland, en 1887, démontra l'action bactéricide de l'essence de thym (notamment vis-à-vis du bacille du charbon).

2- Origine et distribution de la plante:

Thymus vulgaris L. est indigène de l'Europe du sud, il est rencontré depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Ozcan and Chalchat, 2004 et Amiot, 2005). Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale (Kitajima et al., 2004)

Le *Thymus vulgaris* se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian et al., 2003).

Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne. (Poletti, 1988).

3- Place dans la systématique :

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Morales, 2002) synthétisée dans le (Tableau 01).

Tableau 1. Classification botanique de *Thymus vulgaris* (Morales, 2002).

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L.

4- Caractéristiques de la plante :

4-1 Description :

Le thym est une plante ligneuse, les rameaux blanchâtres portent des feuilles opposées, lancéolées ou linéaires, les feuilles sont verdâtres sur le dessus, gris blanc sur le dessous et les fleurs sont réunies en grappe à l'extrémité des rameaux.

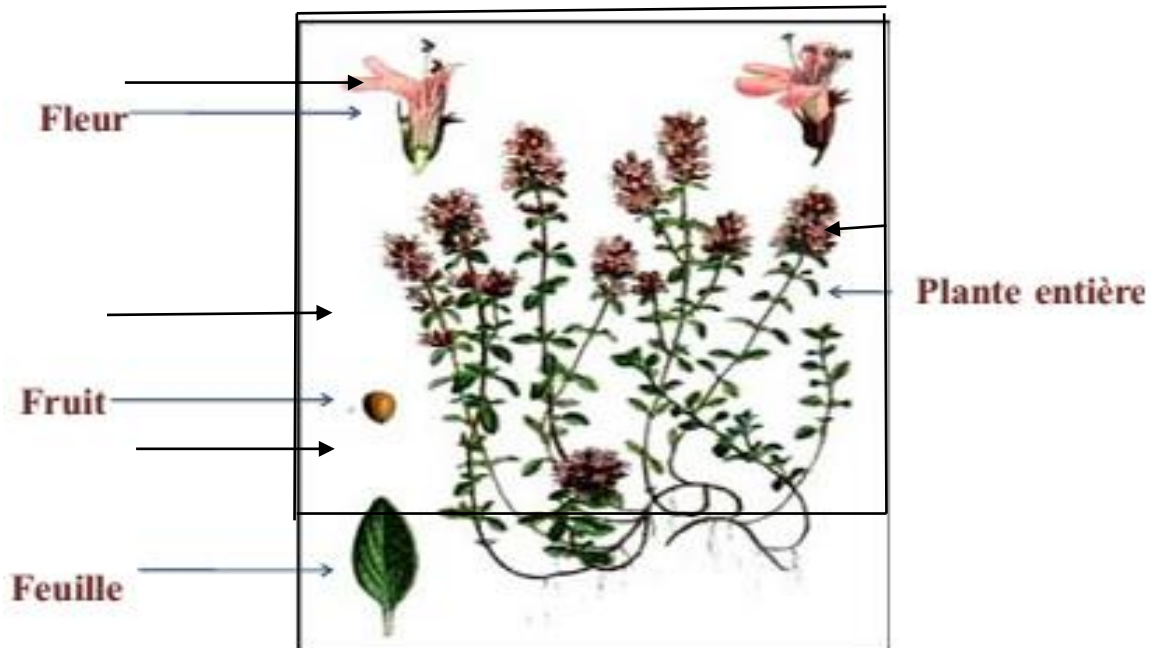


Figure 01. Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L (Iserin, 2001)

4- 2 Culture extérieure :

Le thym se multiplie au printemps par semis, par bouturage ou par division de touffes, peu exigeant au point de vue édaphique. Il s'accommode de tous les terrains même de ceux qui sont humides. Il a besoin de lumière et de la chaleur. Une plantation se refait tous les quatre ans environs.

4- 3 Récolte :

La récolte des sommités et des feuilles est effectuée au tout début de la période de floraison.

4-4- Séchage :

Le séchage de la plante est effectué en groupant les branches jusqu'à 5 cm du sol et il est préférable de faire sécher la tête en bas dans un endroit chaud, sec, ombragé et bien aéré.

4- 5 Conservation :

A l'état frais le thym peut être conservé facilement pendant une semaine dans un sac en plastique au réfrigérateur.

5- Principes actifs du thym :

Le thym comporte plusieurs composés bioactifs :

- **Les acides phénoliques** : constitués principalement d'acide caféique (Cowan, 1999) et d'acide rosmarinique (Takeuchi *et al.*, 2004)
- **Les flavonoïdes**: comportant surtout l'hespéridine, l'eriortécine, le narirutine (Takeuchi *et al.*, 2004) et lutéoline (Bazylko *et al.* ; 2007)
- **Les polyphénols** : représentés particulièrement par les tanins (Cowan, 1999 ; Ozcan *et al.*, 2004).

6-Propriétés et emplois:

6-1 Propriétés générales :

Le thym est un antiseptique puissant, considéré comme un remède efficace dans les affections dues au froid (rhume, grippe, courbature, angine). En infusion, il est stimulant. Il combat les douleurs articulaires ou musculaires. Il est également antispasmodique et antirhumatismal. Il peut soigner l'asthénie physique, les toux convulsives, les affections pulmonaires et l'asthme.

6- 2 Utilisation de *Thymus vulgaris* :

Le *Thymus vulgaris* est une des plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwanet *al.*, 2006). De plus, son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Jordán et al., 2006).

L'épice *Thymus vulgaris* est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, potages et des légumes (Özcan et Chalchat, 2004).

La feuille et la sommité fleurie de *Thymus vulgaris* sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation, flatulence ainsi que dans le traitement

symptomatique de la toux et de la bronchite (**Bruneton, 1999**). Sa feuille est énumérée dans la pharmacopée de fines herbes allemande et britannique. Elle est employée en tant que bronchospasmolytique, expectorant et antibactérien. On dit que la tisane des feuilles de *Thymusvulgaris* favorise le repos et le sommeil (**Kitajimaet al., 2004**).

En usage local, elles sont traditionnellement utilisées en cas de nez bouché, de rhume, pour le traitement des petites plaies après lavage abondant, pour soulager les piqûres d'insectes et les douleurs rhumatismales, et en bain de bouche pour l'hygiène buccale (**Poletti, 1988 et Brunton, 1999**), ainsi que comme additif de bain préparé par décoction qui stimule l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, soulageant de ce fait la dépression nerveuse (**Özcan et al., 2004**). L'huile essentielle de cette plante entre dans les formulations de diverses spécialités :pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires et les préparations pour inhalation (**Bruneton, 1999**).

1-Caractéristiques générales des bactéries spécifiques du yaourt :

La fabrication du yaourt est due à la fermentation conjointe du lait par les deux souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

1-1 *Streptococcus Thermophilus* :

Streptococcus Thermophilus est une bactérie cocci Gram positive, aéro-anaérobie facultative, non mobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages (Dellaglio et al. 1993. Roussel et al., 1994). C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1) et aux antibiotiques. Elle est aussi résistante au chauffage à 60 °C pendant 30 minutes (Dellaglio et al. 1994). Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposées en chaîne de longueurs variables ou par paires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C. Son métabolisme est du type homo-fermentaire (Lamoureux, 2000).

Le rôle principal de *Streptococcus. Thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique et en plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés. Il augmente aussi la viscosité du lait par production de polysaccharides (composé de galactose, glucose, ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et de Mermoz) (Bergamaier, 2002).

1-2 *Lactobacillus bulgaricus* :

Lactobacillus Bulgaricus est un bacille gram positif, immobile, asporulé, microaérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chaînettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Emben Meyerhof. Il est incapable de fermenter les pentoses.

Lactobacillus Bulgaricus est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Marty-Teyssset et al. 2000).

Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le système le plus efficace pour éliminer le peroxyde d'hydrogène est l'utilisation d'une enzyme ; la catalase dont les bactéries lactiques est déficientes. Ces dernières possèdent plutôt un peroxyde (pseudo-catalyse) qui est moins efficace que la

catalase. Comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde d'hydrogène, elles sont dites micro-aérophiles (**Doleyres, 2003**).

2-Intérêts et fonctions des bactéries du yaourt :

2-1 Production d'acide lactique :

La production d'acide lactique est une des principales des fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (**Schmidt et al. 1994**). Le métabolisme est du type homo-fermentaire (production exclusif de l'acide lactique).

L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic ($1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g/l}$ d'acide lactique). Elle se situe entre 100 et 130 °D (**Loones, 1994**).

L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit :

- Il aide à déstabiliser les micelles de caséines, ce qui conduit à la formation du gel,
- Il donne au yaourt son gout distinct et caractéristique, comme il contribue à la saveur et l'aromatisation du yaourt (**Tamime et Robinson, 1999, Singh et al. 2006**)
- Intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (**Leory et al. 2002**).

2-2 Activité protéolytique :

Pour satisfaire leurs besoins en acide aminés, les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséines et de protéines sériques, leur système protéolytique est constituée de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases.

Lactobacillus Bulgaricus possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire. Cette activité protéinique permet d'hydrolyser la caséine en polypeptide.

Streptococcus termophilus est considérée comme ayant une faible activité endopeptidasique. Elle dégrade les polypeptides par son activité exopeptidasique en acides aminés libres. (Schmid et al., 1994).

2-3 Activité aromatique :

Divers composés volatils et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés dans une fermentation de type hétéro-fermentaire. Parmi ceux-ci, l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde, qui provient en grande partie de la thréonine, joue un rôle essentiel dans ces caractéristiques organoleptiques recherchées. La concentration optimale de ce métabolite est estimée à environ 10 ppm. Sa production, due principalement au lactobacille, est augmentée lorsque ce dernier est en association avec le streptocoque qui en élabore de faibles quantités.

L'acétaldéhyde peut provenir du pyruvate, soit par action du pyruvate décarboxylase ou par action du pyruvate déshydrogénase (appelée aussi pyruvate formate lyase). Il peut aussi résulter de la thréonine par l'action de la Thréonine-aldolase.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat qui est dû à la transformation de l'acide citrique, et secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoque. D'autres composés (acétone, acétoïne...etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Ceci résulte d'un choix avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (Anonyme, 1995).

Notons que la saveur caractéristique du yaourt, due à la production du diacétyl et de l'acétaldéhyde et qui est recherchée dans les produits type (nature), est en partie masquée dans les yaourts aromatisés.

2-4 Activité texturant :

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui en forment des filaments, limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt.

L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (EPS) qui selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composé de rhamnose, arabinose et marmoz (**Schmidt et al. 1994**).

Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *Streptococcus Thermophilus*. Mais d'après (**Tamime, 1999**), *Lactobacillus Bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose à des rapports de 4/1/1.

3-Comportement associatif des deux souches :

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus* se développent bien en association (appelée proto-coopération) dans des cultures mixtes (**Figure 01**) ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel.

Ces bactéries, par leur activité acidifiante, ont un effet bénéfique du point de vue qualité hygiénique du produit. En parallèle, elles engendrent des produits secondaires qui contribuent à la qualité organoleptiques du yaourt. D'un point de vue nutritionnel, l'activité fermentaire de ces espèces lactiques favorise une solubilisation des différents constituants du lait, améliorent ainsi leur biodisponibilité (**Courtin et al. 2002, Ngounou et al. 2003**).

La fermentation des sucres en acides lactiques est une caractéristique des bactéries lactiques qui permet de les classer en bactéries homofermentaires ou hétérofermentaire. Les bactéries lactiques produisant d'autres composés que l'acide lactique tel que l'éthanol, le CO₂ et l'acide formique sont hétérofermentaires (**Figure 01**). Ainsi le métabolite principal et majoritaire des bactéries lactiques est l'acide lactique (**Mahaut et al. 2000**).

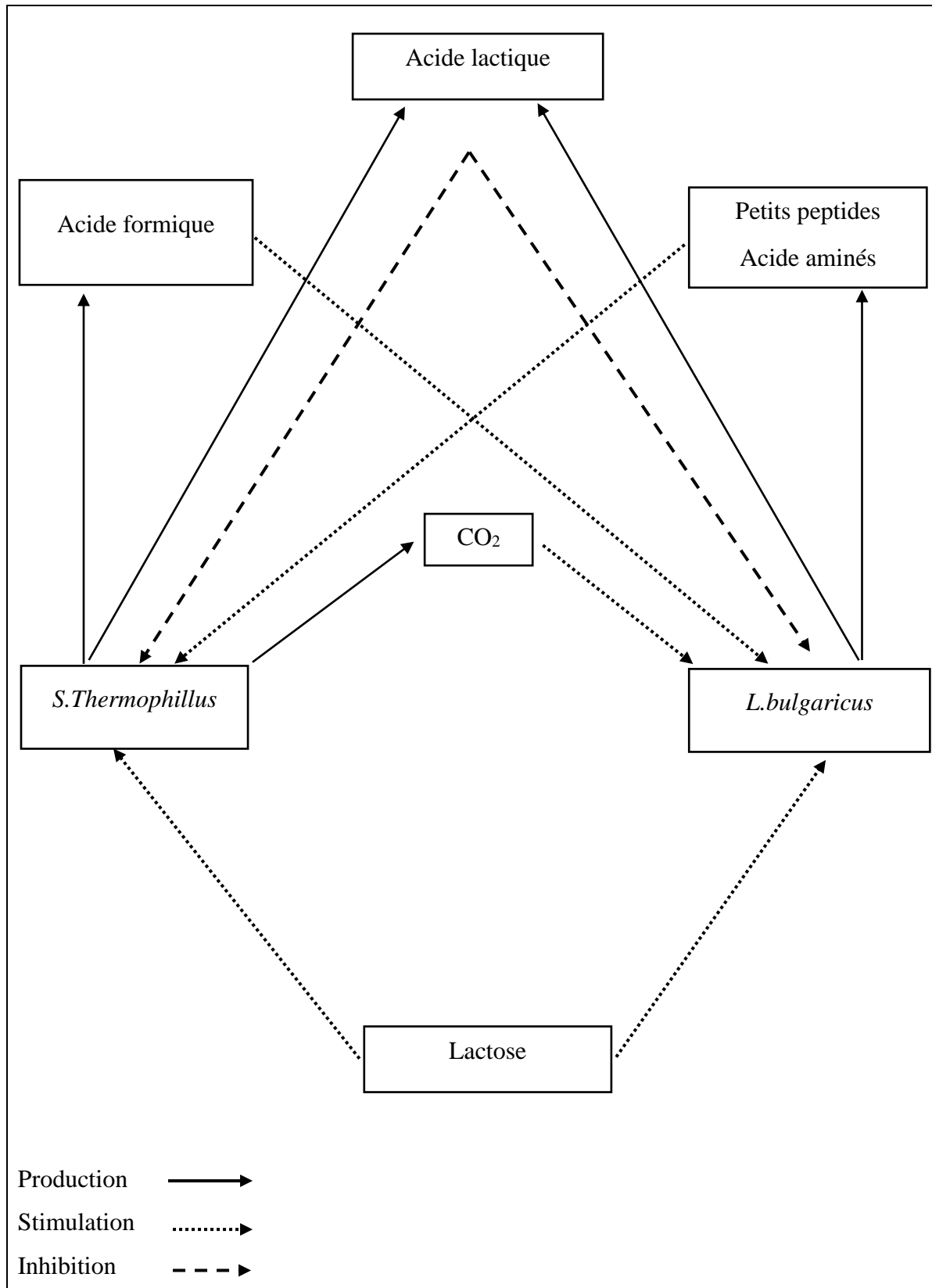


Figure 01. Schéma illustrant les interactions de *streptococcus Thermophilus* et *Lactobacillus Bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut et al. 2000).

1-Objectifs :

Ce travail expérimental consiste à suivre l'effet antimicrobien des extraits de *Thymus vulgaris* vis-à-vis de deux germes spécifiques du yaourt dont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en vue de comprendre le type d'action inhibitrice que peuvent exercer les principaux composés bioactifs de thym obtenus par usage de l'hexane comme solvant d'extraction sur ces deux germes lactiques.

2- Zone de prélèvement de l'espèce végétale thymus vulgaris :

La récolte de la plante a été effectuée le mois de Mars 2017 dans la région de Mecheria relevant de la Wilaya de Naïma située à l'ouest d'Algérie (Latitude : 35.51011 et Longitude : 0.80343).

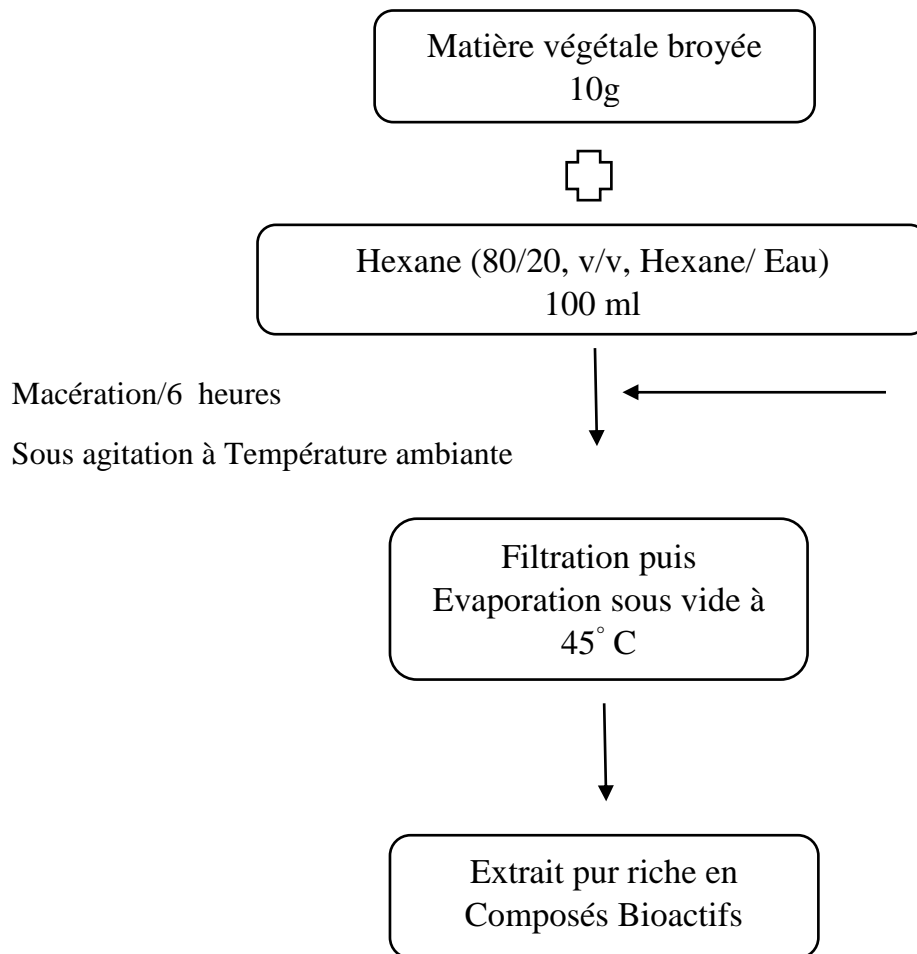
3-Préparation de l'échantillon :

Un échantillon de 3 kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce étudiée, est étalé sur du papier aluminium, puis séchée à l'air ambiant durant 2 semaines. Les échantillons séchés sont enfin broyés dans un broyeur à lame de cuisine puis mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) et à l'abri de l'humidité.

4-Extraction des composés bioactifs :

L'extraction des principaux composés bioactifs tels les polyphénols contenus dans la *Thymus vulgaris* est effectuée par la méthode décrite par (Sultana et al ; 2009). Cette méthode d'extraction n'est qu'un procédé d'extraction discontinu solide-liquide par macération et qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante durant quelques temps et à extraire les constituants solubles par évaporation du solvant sous vide.

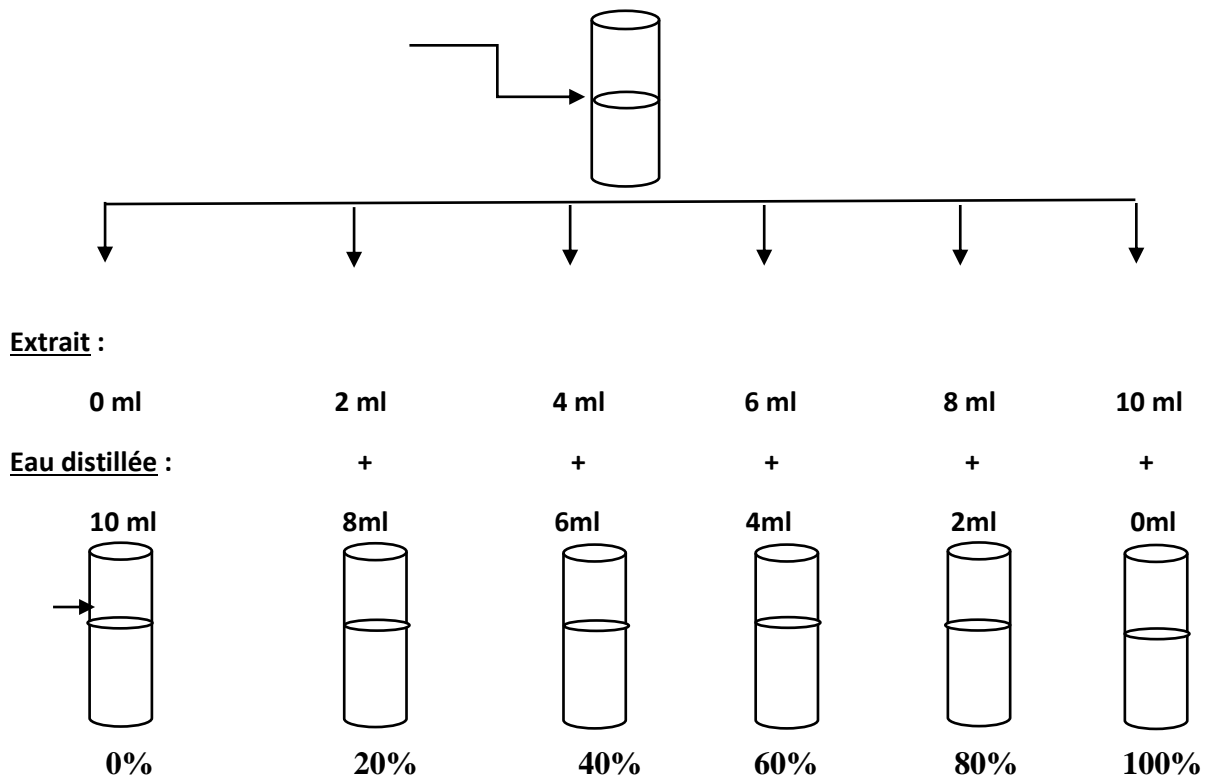
L'extraction des composés bioactifs de la plante est réalisée par usage de l'hexane comme solvant d'extraction. Elle a été effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g en triples répétitions de matière végétale broyée. Chaque échantillon de broyat de matière végétale est mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau, v / v). L'extraction par macération à froid de chaque mélange est laissée pendant 6 heures à température ambiante sous agitation. Puis filtré sur papier filtre Whatman ayant une porosité de 0,2µm. L'extrait pur est enfin obtenu après évaporation sous vide à 45 °C au rotavapeur(BÜCHI) (**Figure 03**).



FigureN° 03. Etape d'extraction des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* selon le protocole de (Sultana et al., 2009).

4- Préparation des différentes solutions expérimentales :

A partir de l'extrait pur de thym obtenu comme préalablement des solutions diluées à l'eau distillée à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100% ont été préparées ; ils représentent les solutions de travail à base de composé bioactifs de (thym) *Thymus vulgaris* (**Figure 04**).



.Figure 04.Préparation des différentes solutions expérimentales.

5- Etude des effets antimicrobiens des extraits de thym :

5-1 Activation des souches microbiennes expérimentales :

L'étude a concerné deux souches pures de références et spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Chaque espèce lactique est tout d'abord activée avant son utilisation expérimentale. Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée a été préalablementensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37 °C durant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution est ensuite pris pour être ensemencé en surface d'un milieu gélosé en boîte pétri spécifique contenant un milieu spécifique gélosé de croissance pour chaque espèce microbienne (MRS ou M17) puis le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures (Figure 05).

0,25 g *Lactobacillus bulgaricus* (lyophilisé) 0,25 g *Streptococcus thermophilus* (lyophilisé)

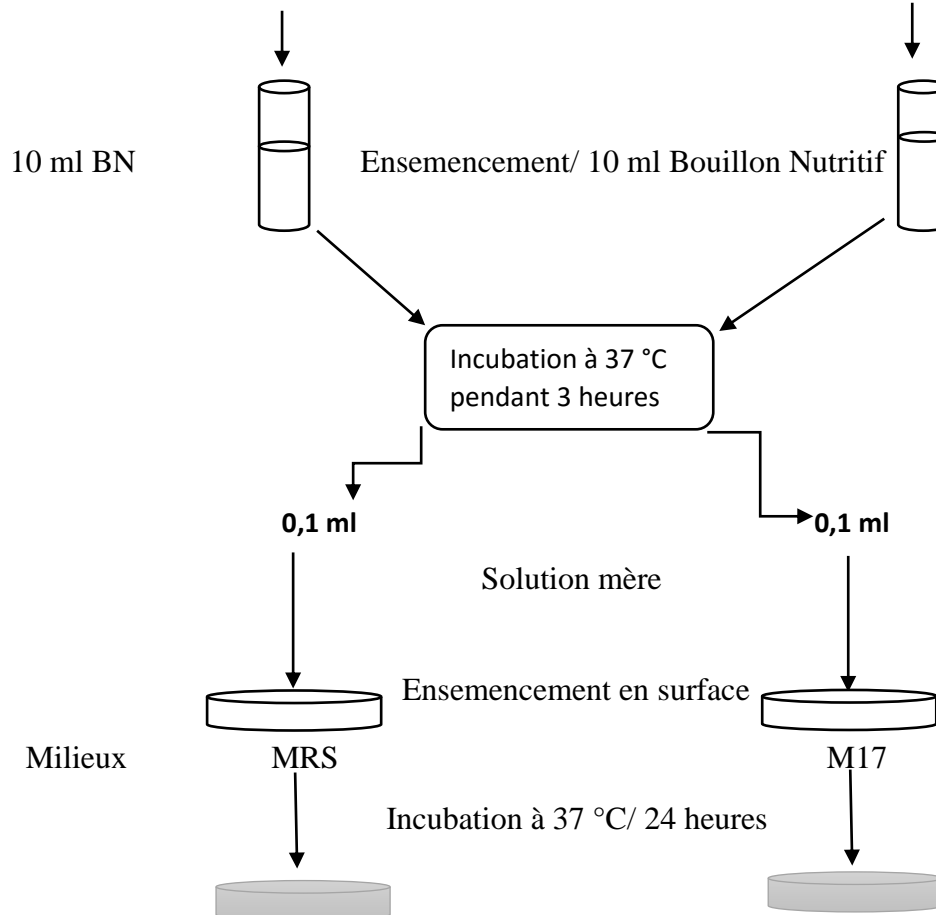


Figure 05. Activation de souche bactérienne.

5-2 Méthode de contact direct :

Une colonie d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée comme sur milieu solide gélosé spécifique est prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, chacune est ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures. A partir de ces dernières solutions dont chacune constitue une solution mère d'une espèce de bactérie lactique donnée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant à 10^{-5} pour respectivement les *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus bulgaricus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale sont ensuite individuellement ajoutés à 09 ml de chaque extrait de thym dilué à l'eau distillée, respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%.

Les mélanges des solutions sont enfin ensemencés en triple essais (03 boites de Pétri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance pour chaque espèce microbienne. La lecture du nombre de colonies développé est effectuée après

incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures (Bourgeois et Leveau, 1980) (FigureN°06).

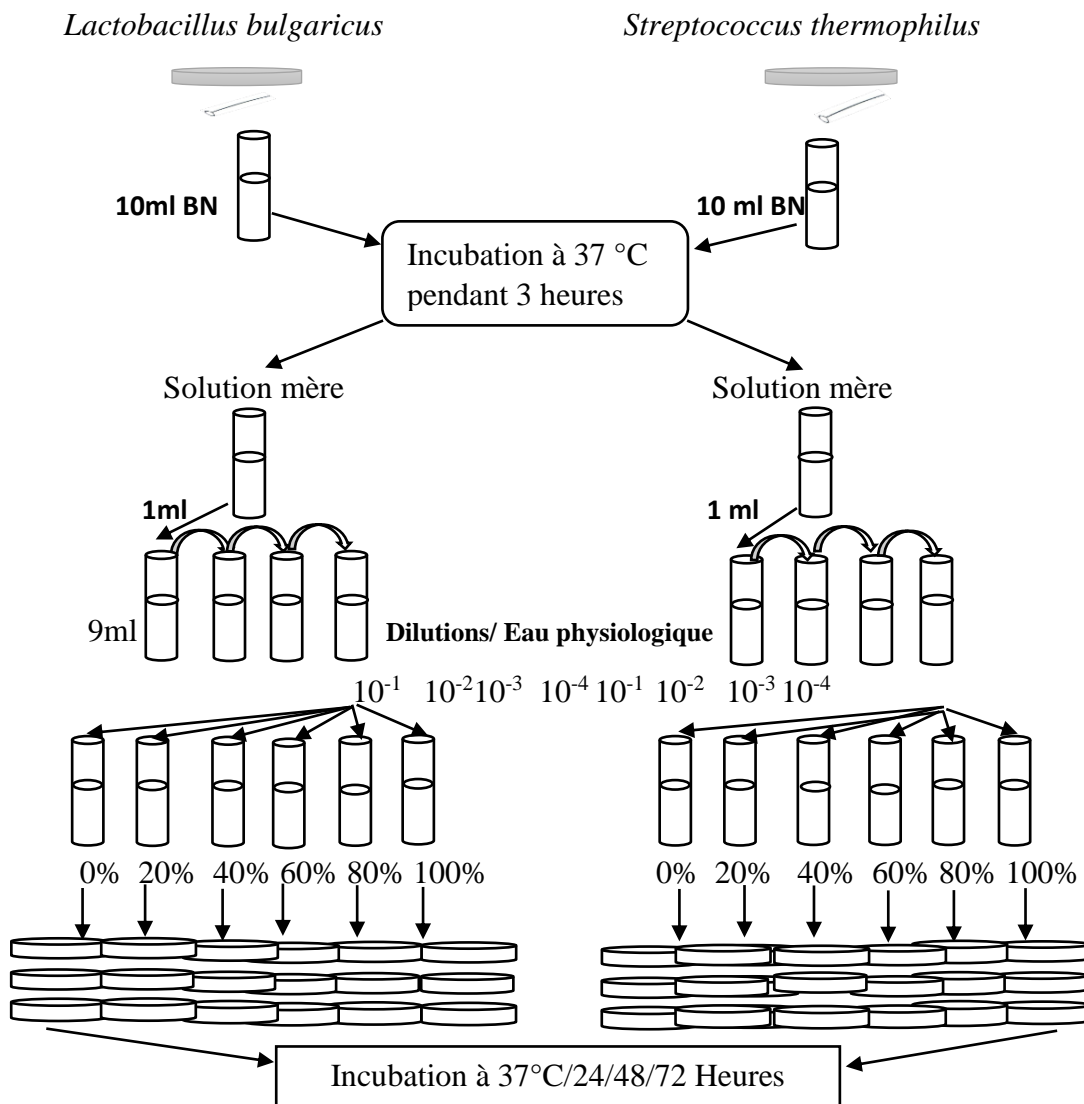


Figure 06. Méthode de contact direct.

5-3 Méthode des disques par diffusion sur gélose :

Les disques sont confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 5), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contaminations aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques sont stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

Une colonie de chaque espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif ; ce mélange a constitué la solution mère.

Des prises de volume de 1ml de cette dernière solution ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MRS ou M17 selon l'espèce microbienne étudiée.

Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Pénicilline, ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé spécifique ensemencé au germe lactique approprié (Prescott et al., 2003).

La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures à l'aide d'un pied à colis (Guignar, 1998). (Figure 07).

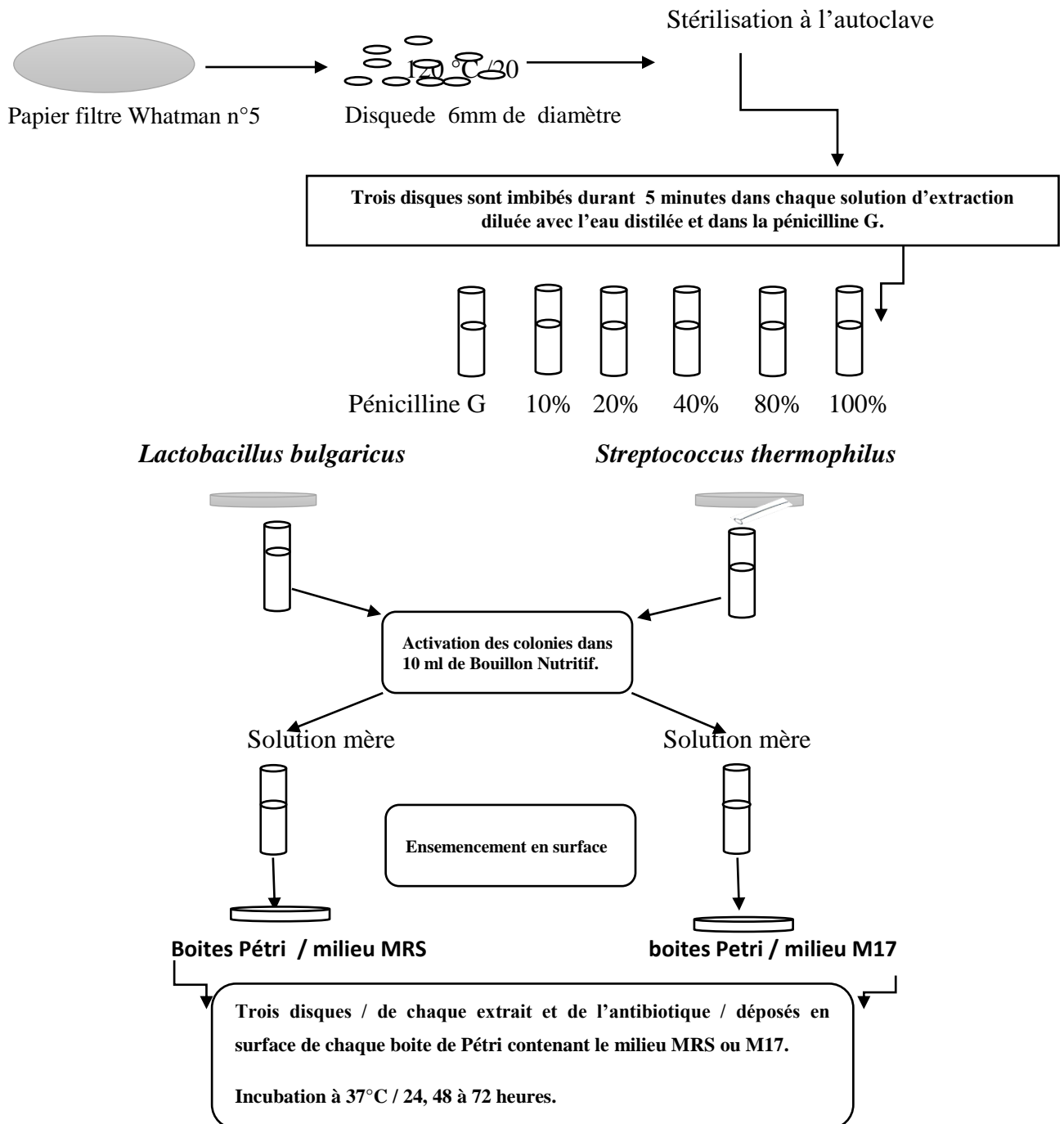


Figure 07. Méthode des disques par diffusion sur gélose.

5-4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ou en principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Denis *et al.*, 2011).

Dans le cas de notre étude, c'est les principes actifs des extraits de la matière végétale du thym qui sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des espèces de germe spécifiques du yaourt (*Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus bulgaricus*). Ainsi, une colonie jeune de *Streptococcus thermophilus* ou de *Lactobacillus bulgaricus* est prélevée à l'aide d'une anse à platine dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir l'inoculum. Des prises de 0,2 ml de chaque inoculum sont introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton.

Les mélanges des tubes contenant les extraits de thym préparés à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie lactique sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures (Moroh *et al.*, 2008).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i est égale à d_f ($d_i = d_f$).

Le taux de survie du microorganisme est mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

$$S = 100 \times (d_f - d_i / D_f - D_i)$$

S: Taux de survie du microorganisme en %.

d_i : Densité optique dans la solution phénoliqueensemencée sans incubation.

d_f : Densité optique dans la solution phénoliqueensemencée après incubation.

$d_f - d_i$: Différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.

$D_f - D_i$: différence de densité optique sans extraits de thym avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (Kra *et al.*, 2001 ; Zrihiet *al.*, 2007).

5-5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La concentration minimale bactéricide d'une espèce de germe *lactique* étudié représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum initial après incubation (Moroh et al., 2008).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle est ensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, également ensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5cm et incubé à 37 °C durant 18 à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB. :

5-6 Traitement statistique :

Les résultats ont subi une analyse de variance mono factorielle en randomisation totale suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS (STAT BOX 6.4).

1-Résultats :

1-1. *Lactobacillus bulgaricus* :

1-1-1 Méthode de contact direct.

En fonction des taux des extraits de thym variables de 20, à 40 et à 60%, le nombre de germes *Lactobacillus bulgaricus* a connu un abaissement notable de 92.10^4 , à $81,67.10^4$ et à $51,67.10^4$ UFC/ ml successivement par rapport au témoin qui a enregistré une prolifération plus élevée (150.10^4 UFC/ ml en moyenne).

A partir du taux d'extrait préparé à 80% la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* est totalement inhibée.

Les variations de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* en fonction des taux d'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* montre des différences hautement significatives (**Tableau 02**).

Tableau 02. Effet des différentes dilutions d'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions expérimentales		Nombre de colonies (UFC/ml).	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym	
Concentration d'extrait à l'hexane aqueux de thym	0%	150.10^4	a				** P<0.01)	
	20%	92.10^4	b					
	40%	$81,67.10^4$			c			
	60%	$51,67.10^4$				d		
	80%	0						e
	100%	0						e

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec n (nombre de répétition) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; UFC : Unité Forme nt Colonie ; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-1-2 Diamètre d'inhibition :

Les effets d'inhibitions effectués par la méthode des disques montrent que le diamètre de la zone d'inhibition est d'autant plus remarquable que la solution est plus concentrée en extrait de thym.

Le diamètre d'inhibition le plus faible ($p < 0,01$) est réalisé avec un taux d'extrait de thym de 20 et 40 et 60% ; 6,33, 8,8,33 mm, respectivement.

Par contre, les résultats les plus élevés ($p < 0,01$) sont obtenus avec des concentrations d'extrait de thym préparés à 80% et 100% ; 10,67, mm en moyenne.

L'antibiotique enregistre un diamètre d'inhibition le plus élevé, 15 mm. Tandis que pour le témoin 0%, aucune zone d'inhibition n'a été détectée.

L'analyse de variance dévoile l'effet hautement significatif du facteur étudié (concentrations d'extraits de thym) sur les variations des diamètres des zones d'inhibition chez l'espèce *Lactobacillus bulgaricus* (**Tableau 03**).

Tableau 03. Effet des différentes dilutions d'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions expérimentales		Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym
Concentration d'extrait à l'hexane aqueux de thym	0%	0	0				e	** (P<0.01)
	20%	6,33	1,16				d	
	40%	8	0			c		
	60%	8,33	1,16			c		
	80%	10,67	0,58		b			
	100%	10,67	1,53		b			
Pénicilline		15	0	a				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes, suivis des écarts types correspondant, avec n (nombre de répétition) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-1-3 Taux d'inhibition :

Les variations des taux d'inhibitions de l'extrait à l'hexane aqueux de thym chez *Lactobacillus bulgaricus* sont marquées tout d'abord par de faibles résultats de 42,217% réalisés avec l'extrait dilué à 20%. Puis, les taux d'inhibition sont rehaussés à des taux significativement plus élevés ($p < 0,01$), variant de (53,33, à 55,553% et à 71,107%,) pour les extraits préparés à 40, 60 et 80% successivement, jusqu'à atteindre le taux le plus élevé ($p < 0,01$), estimé à 71,11% dans la solution mère d'extrait pur ; sans dilution préparée à 100%. La pénicilline a enregistré le taux d'inhibition référentiel le plus élevé de 100% par comparaison aux différentes solutions d'extraits de thym (**Tableau 04**).

Tableau 04. Effet des différentes dilutions d'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions expérimentales		Taux d'inhibition (%)	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym
Concentration d'extrait à l'hexane aqueux de thym	0%	0				e	** (P<0.01)
	20%	42,217				d	
	40%	53,33			c		
	60%	55,553			c		
	80%	71,107		b			
	100%	71,11		b			
Pénicilline		100	a				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes, avec n (nombre de répétition) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-1-4 Concentration Minimale Inhibitrice: CMI.

A travers la mesure de la turbidité, il apparaît que le taux de survie du germe *Streptococcus thermophilus* s'annule déjà dans la solution d'extrait de thym préparée à 60% et ceci après 24 heures de culture ; cette concentration est donc la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (**Tableau 05**).

Tableau 05. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Souche	Densité optique	Témoin	Concentration de l'extrait à l'hexane aqueux de thym				
		0%	20%	40%	60%	80%	100%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	di	0,021	1,713	1,845	2,003	2,291	2,317
	df	0,221	1,873	1,93	1,946	2,201	2,161
	df-di	0,2	0,16	0,085	-0,057	-0,09	-0,156
	S (%)	100	80	42,5	0	0	0
CMI	CMI = Extrait à 60%						

df-di : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant (di)et après incubation (df) à 37°C durant 18 heures ;S : Taux de survie du microorganisme en % ; CMI : Concentration minimale inhibitrice.

1-1-5 Concentration Minimale Bactéricide :

La (Figure 8) représente d'une part (à gauche) le nombre de germes développé après 24 heures d'incubation à 37 °C, des différentes dilutions décimales de l'inoculum de *Lactobacillus bulgaricus* allant de 10^{-1} , à 10^{-2} à 10^{-3} et 10^{-4} et d'autre part (à droite) les différentes solutions de l'extrait à l'hexane aqueux de thym préparés à 0, 20, 40 ,60,80 et 100% ensemencés au germes et ayant servi à la détermination de la concentration minimal inhibitrice après 24 heures.

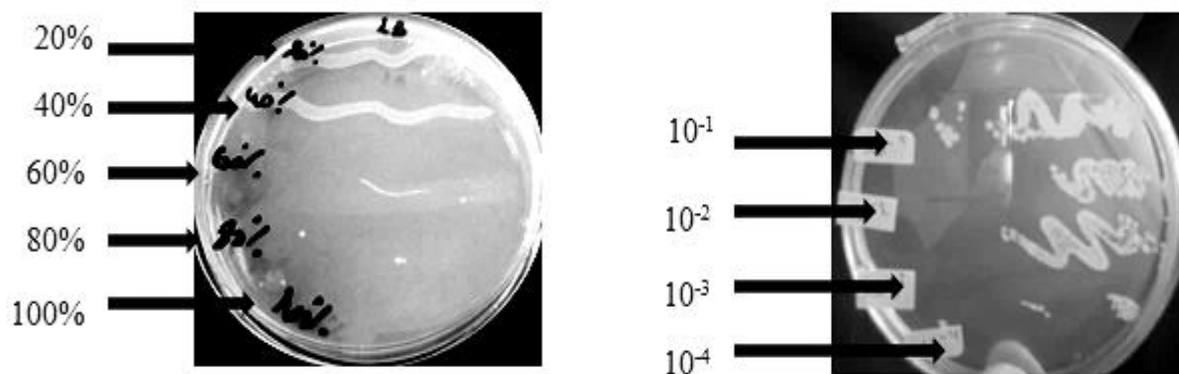


Figure 08. Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* chez *Lactobacillus bulgaricus*.

Il apparait que l'extrait à 80% à engendré un pourcentage de survie proche de 0,01 de l'espèce microbienne expérimentale *Lactobacillus bulgaricus* ; cette solution à base d'extrait de Thym constitue donc la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

1-1-6 Rapport CMB/CMI :

Le rapport CMB/CMI obtenu est d'environ à 1,333 monte que l'extrait à l'hexane aqueux de thym exerce un effet inhibiteur de type bactéricide chez *Lactobacillus bulgaricus*. (Tableau 06).

Tableau 06. Action inhibitrice de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance des *Lactobacillus bulgaricus*.

Désignation	CMI	CMB	(CMB/CMI)	Effet Inhibiteur
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	60%	80%	1,333	Bactéricide
Normes	✓ D'après (Olivier., 2007): CMB/CMI \leq 2 (Effet bactéricide). CMB/CMI \geq (Effet bactériostatique). ✓ D'après (Marmonier., 1990): CMB/CMI \leq 4 (Effet bactéricide). CMB/CMI \geq 4(Effet bactériostatique).			

1-2. *Streptococcus thermophilus*

1-2-1 Méthode de contact direct :

Les résultats de l'effet de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance de la bactérie spécifique du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* sont représentés dans le (Tableau 07).

Partie 03 : Résultats et Discussion

Le développement du nombre de *Streptococcus thermophilus* s'avère inversement proportionnel avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de thym. Le nombre de ses germes a connu une nette diminution de 134.10^4 à $45,33.10^4$ UFC/ ml dans les solutions variables de 0% à 60% d'extrait de thym. A partir de la solution préparé à 80% de l'extrait aucune prolifération du germe n'a été observée.

TableauN°07. Effet des différentes dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Solutions expérimentales		Nombre de colonies (UFC/ml)	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym	
Concentration d'extrait à l'hexane aqueux de thym	0%	134.10^4	a				** (P<0.01)	
	20%	98.10^4		b				
	40%	$85,33.10^4$			c			
	60%	$45,33.10^4$				d		
	80%	0						e
	100%	0						e

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec n (nombre de répétition) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; UFC : Unité Forme nt Colonie, a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-2-2. Diamètre d'inhibition :

La méthode des disques montre que le diamètre de la zone d'inhibition de l'espèce bactérienne lactique étudiée (*Streptococcus thermophilus*) est d'autant plus remarquable que la solution testée est plus concentrée en extrait de thym.

Le diamètre d'inhibition le plus faible du germe ($p<0,01$) est réalisé avec un taux d'extrait de thym de 20 et 40 et 60% ; 5,67, 6,67 ,8 mm, respectivement.

Par contre, les résultats les plus élevés ($p<0,01$) sont obtenus avec des concentrations d'extrait de thym préparés à 80% et 100% ;10,33 et 11 mm, en moyenne, respectivement.

L'antibiotique a enregistré le diamètre d'inhibition le plus élevé, (14 mm) ($p<0.01$) ; alors que pour le témoin 0%, aucune zone d'inhibition n'a été détectée.

Partie 03 : Résultats et Discussion

L'analyse de variance dévoile l'effet hautement significatif du facteur étudié (concentrations de l'extrait à l'hexane aqueux de thym) sur les variations des diamètres des zones d'inhibition chez l'espèce *Streptococcus thermophilus* (Tableau 8).

Tableau 8. Effet des différentes dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur les variations des diamètres d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.

Solutions expérimentales		Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym
Concentration d'extrait à l'hexane de thym	0%	0	0				e	** (P<0.01)
	20%	5,67	0,58				d	
	40%	6,67	0,58				d	
	60%	8	1		c			
	80%	10,33	0,58	b				
	100%	11	1	b				
Pénicilline		14	1	a				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes, suivis des écarts types correspondant et avec n (nombre de répétitions) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-2-3 Taux d'inhibition :

Les taux d'inhibition de *Lactobacillus bulgaricus* les plus faibles ($p < 0,01$) sont réalisés avec l'extrait à l'hexane aqueux de thym préparé des concentrations de 20 et 40% ; 40,477 vs 47,62% , en moyenne.

Les extraits préparés à 60, 80 et 100% ont induit des résultats d'inhibitions plus ou moins important comparativement au reste des solutions expérimentales ($p < 0,01$); 57,14, 73,81 et 78,57% en moyenne, successivement.

Partie 03 : Résultats et Discussion

La pénicilline a enregistré le taux d'inhibition significativement ($p < 0.05$) le plus élevé par rapport aux différentes solutions expérimentales d'extrait à l'hexane aqueux de thym (Tableau 09).

Tableau 09. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.

		Taux d'inhibition. (%)	Groupes homogènes				Effets de la concentration d'extrait de thym
Concentration d'extrait à l'hexane de thym	0%	0				e	** ($P < 0.01$)
	20%	40,477				d	
	40%	47,62				d	
	60%	57,143			c		
	80%	73,81		b			
	100%	78,57		b			
Pénicilline		100	a				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes, avec n (nombre de répétitions) égal à 3 ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié (dilutions de l'extrait à l'hexane aqueux) ; p : seuil de probabilité à 1 ou 5% ; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens selon le test de Newman et Keuls.

1-2-4 Concentration Minimale Inhibitrice : CMI.

La concentration minimale inhibitrice des extraits à l'hexane aqueux de thym vis-à-vis de *Streptococcus thermophilus* est obtenue à un niveau de dilution de 60%.

En effet, le taux de survie du germe étudié après 24 heures d'incubation en présence de l'extrait de thym préparé à une concentration de 60% est nulle ; cette extrait représente donc la concentration minimale inhibitrice de la bactérie (*Streptococcus thermophilus*) (Tableau 10).

Tableau 10. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Souche	Densité optique	Témoin	Concentration de l'extrait à l'hexane aqueux de thym				
		0%	20%	40%	60%	80%	100%
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Di	0,047	1,623	1,712	2,032	2,265	2,295
	Df	0,3	1,795	1,821	1,946	2,243	2,261
	df-di	0,253	0,172	0,109	-0,086	-0,022	-0,034
	S (%)	100	67,98	43,08	0	0	0
	CMI	CMI = Extrait à 60%					

df-di : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant (di)et après incubation (df) à 37°C durant 18 heures ;S : Taux de survie du microorganisme en % ; CMI : Concentration minimale inhibitrice.

1-2-5 Concentration Minimale Bactéricide : CMB

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'espèce *Streptococcus thermophilus* est observée avec l'extrait à l'hexane aqueux préparé à 60% (**Figure N°09**).



Figure 9. Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur le *Streptococcus thermophilus*

1-2-6 Rapport CMB/CMI :

Le rapport CMB/CMI de l'extrait à l'hexane aqueux de thym sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* a été évalué à 1.

Ce rapport montre clairement l'effet de type bactéricide qu'exerce l'extrait à l'hexane aqueux de thym sur la croissance du germe étudié *Streptococcus thermophilus* (**Tableau 11**).

Tableau 11. Action inhibitrice de l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* sur la croissance des *Streptococcus thermophilus*.

Désignation	CMI	CMB	(CMB/CMI)	Type d'Inhibition de l'extrait de thym
<i>Streptococcus thermophilus</i>	60%	60%	1	Bactéricide
Normes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ D'après (Olivier., 2007): CMB/CMI ≤ 2 (Effet bactéricide). CMB/CMI ≥ 4 (Effet bactériostatique). ✓ D'après (Marmonier., 1990): CMB/CMI ≤ 4 (Effet bactéricide). CMB/CMI ≥ 4 (Effet bactériostatique). 			

2- Discussion :

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin (eau distillée stérile 0%), le nombre des germes spécifiques du yaourt *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* diminuent significativement ($p < 0.01$) avec l'augmentation de la concentration (de 20 à 60%) d'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* et la croissance des deux germes a été complètement achevée à 80% d'extrait de la plante.

Ces réponses résultent certainement du fait que l'extrait aqueux à l'hexane renferme de multiples composés bioactifs antimicrobiens recensés par plusieurs auteurs en particulier dans le *Thymus vulgaris* dont (huiles essentielles, flavanoides, polyphénols, thymol...etc.) et qui semblent inhiber à de fortes concentrations de 80 et 100% (extrait pur) totalement la croissance des deux bactéries lactiques spécifiques du yaourt ; *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

Cette activité antimicrobienne de l'extrait au l'hexane de thym peut être expliquée par la présence de faibles teneurs de thymol, un phénol alkylique qui cause même à de faibles doses la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille et al., 2003). En effet, l'extrait acétonique de *Thymus vulgaris* a montré une activité inhibitrice à une concentration de 0.5 mg/ml contre la *Mycobacterium tuberculosis* (Lall et Meyer, 1999).

La méthode des disques a enregistré des résultats d'inhibition des germes *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* presque similaires entre l'antibiotique (pénicilline) et les solutions de l'extrait à l'hexane aqueux de Thym préparées à 80 et 100% ; 15 vs 10.67 vs 10.67 mm et 14 vs 10,33 vs 11 mm, en moyenne respectivement.

Par ailleurs, par comparaison à la pénicilline, les solutions d'extrait de thym préparées à 80 et 100% ont marqué des taux d'inhibitions de *Lactobacillus bulgaricus* très élevés

Partie 03 : Résultats et Discussion

($p < 0.01$) de l'ordre de 71,11%, en moyenne ; alors que l'extrait préparé à 20% enregistre un faible résultat estimé à 42,217%. Concernant les *Streptococcus thermophilus*, la solution d'extrait pure de la plante et celle préparée à 80% d'extrait à l'hexane aqueux ont montré des taux d'inhibitions très proche de l'antibiotique ; 78,57 et 73.81 %, en moyenne.

Apparemment, l'activité inhibitrice des solutions préparées à 80 et 100% de l'extrait de thym ont été très proches de celui de la pénicilline considéré comme étant un antibiotique à large spectre antimicrobien. Les extraits de thym peuvent ainsi être utilisés et préconisé comme moyen thérapeutique naturelle à moindre coût contre de nombreuses maladies infectieuses (dermatophytes, contaminations nosocomiales, angines, infections urinaires..etc.) en substitution aux traitements conventionnels dont le traitement abusif peut développer une certaine résistance des germes causales et pouvant par voie de conséquence nuire d'une manière drastique à la santé des patients.

Ceci confirme que l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* contient bien des composés bioactifs antimicrobiens qui exercent un effet inhibiteur sur la croissance des souches spécifiques du yaourt ; *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (**Ezmirly et al. 1979**).

Selon le rapport CMB/CMI trouvé de 1.333 pour les *Lactobacillus bulgaricus* et de 1 pour les *Streptococcus thermophilus* et d'après (**Olivier ; 2007**) étant donné que ces rapports sont inférieurs ou égale à 2, l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* récolté dans la région de Mechria a Naama -Algérie- exerce donc un effet de type bactéricide vis-à-vis des germes étudiés. (**Marmonier ; 1990**); rapporte en d'autre part que lorsque le rapport (CMB/CMI) d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égale 4 ceci suppose aussi qu'elle présente un effet bactéricide ; alors que si le rapport est supérieur à 4 elle présente plutôt un effet bactériostatique.

D'une façon générale l'extrait à l'hexane aqueux de *Thymus vulgaris* exercent un effet de type bactéricide très redoutable vis-à-vis des deux bactéries lactiques spécifiques du yaourt à savoir (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*). Il est bien établi que certains composés bioactifs des plantes dont les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions avec les effecteurs ou substrats et ions métalliques pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999 ; Dhaouadi et al., 2010). Il apparaît donc nécessaire d'orienter des études pour la caractérisation des principaux composés bioactifs contenus dans l'extrait à l'hexane de *Thymus vulgaris* récolté spécialement dans la région de Naama-Algérie et leurs mécanismes d'action chez particulièrement *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Cependant, l'incorporation de ces extraits dans le yaourt devra se faire avec prudence et de préférence à des concentrations de moins de 20%.

Conclusion

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparaît que la solution d'extrait à l'hexane aqueux de thym (*Thymus vulgaris*) récolté dans la région de Naama Algérie exerce des effets antimicrobiens certains contre la croissance des germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

La méthode des disques montre que le diamètre d'inhibition des germes lactiques est d'autant plus augmenté que les solutions inhibitrices sont fortement concentrées en extrait de *Thymus vulgaris*. La méthode de contact direct dévoile que la prolifération de ces germes lactiques sur milieux spécifiques est inhibée totalement à des concentrations d'extrait de 80%.

La Concentration Minimal Inhibitrice de la croissance de *Streptococcus thermophilus* est observée avec la solution préparée à 60% de l'extrait de thymus vulgaris ; alors que la Concentration Minimale Bactéricide du germe est enregistrée à 60% de l'extrait à l'hexane aqueux de thym.

Par ailleurs, la Concentration Minimal Inhibitrice de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* est observée à une concentration de 60% d'extrait ; par contre, la Concentration Minimal Bactéricide est enregistrée à 80% de l'extrait.

Les composés bioactifs ont démontré ainsi une action de type bactéricide chez les deux germes lactiques étudiés : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Ainsi, il semble très intéressant d'introduire l'extrait à l'hexane de thym dans certains dérivés de lait tels (le yaourt brassé, le yaourt étuvé et les fromages) à des concentrations bien inférieures à 60% afin de préserver au maximal les micro-organismes, lactiques, bénéfiques et spécifiques des produits transformés en l'occurrence les *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* qui devront se manifester dans le yaourt en terme de fabrication à un nombre de 10^7 germes vivants/ml.

Références bibliographies :

A.F.N.O.R, « Les huiles essentiels », analyse par chromatographie en phase gazeuse Sur colonne capillaire chirale méthode générale T75-425, Mai 1997.(PRoprietegenerale ,53

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F. (2009) Antibacterial effects of NutraceuticalPlants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa* Turk. *J. Biol.* **30** : 239-242.

Amiot, J. (2005).Thymus vulgaris, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires, Montpellier, ENSA.

Anonyme, « Saveurs du monde / thym historique», 1998. 55 pp.

ANONYME. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition, 28pp.

BAZYLKO A. et STRELECKA H. 2007. A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts. *Fitoterapia.*, **78** : 391-395.

BERGAMAIER D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de doctorat, Université de Laval, Canada.

Bourgeois, C. M. and J.Y. Leveau, 1980. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique. Lavoisier : Tech. Et Doc., pp : 331.

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *3ème Ed Tec&Doc. Paris.*

COURTIN P., MONNET M. and RUL F. (2002).Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/ *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148, 3413-3421.

Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, **12** (4) : 564-570.

Références bibliographiques

Cowan M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564-582.

DELLAGLIO F., DE ROSSARTH H., TORRIANIS S., CURK M. ET JANSSENS D. Caractérisation générale des bactéries lactiques. Tec&Doc (Eds), Loriga.,(1994).

Denis, F., E. Bingen, C. Martin, M.C. Ploy and R. Quentin, 2011. Bacteriologie Médicale. 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.

Dhaouadi K., Raboudi F., Estevan C., Barrajo N E., Vilanova E., Hamdaoui M. and Fattouch S. Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 59: 402-406.

DOLEYRES Y. (2003). Production en conteneur du ferment lactique probiotique par la technologie des cellules immobilisées. Thèse doctorat. Université de Laval. Québec. 167 pages.

Guignard, J. L., 2000. Biochimie végétale. Dunod, Paris., pp: 274.

Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.

J.GOUST, «Thymus et sarriette» éd. Par Actes Sus ? collection Chroniques du potager, 1999. 53 pp.

Jordán M.J., Martínez R.M., K.L. Goodner, Baldwin E.A., Stomayor J.A. (2006) Seasonal Variation of *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and products* 24: 253-263.

Kaloustian, J., T. F. El-Moselhy and H. Portugal (2003). "Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*)."
Thermochemica Acta 401(2): 77-86.

Kitajima, J., T. Ishikawa, A. Urabe and M. Satoh (2004). "Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme."
Phytochemistry 65(24): 3279-3287

Kra, A.K.M., 2001. Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISC A contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle UFR Biosciences. Univ. Abidjan., pp: 126.

Références bibliographiques

LAMOUREUX L. (2000). Exploitation de l'activité β -galactosidase de culture de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. Mémoire de maîtrise, Université de Laval, Canada.

LEORY F., DEGEEST B. and DE VUYST L. (2002). A novel area of predictive modeling: describing the functionality of beneficial micro-organisms in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73:251-259.

LOONES A. (1994). Lait fermenté par des bactéries lactiques. In « bactéries lactiques ». Vol II. DE ROISSART H. et LUQUET F.M. ED. Loriga, Paris 37-151.

MAHAUT M., JEANTET R., SCHAK P. et BRUL G. (2000). Les produits industriels laitiers. Ed, techniques et documentation, Lavoisier, Paris. 26-40.

MARTY-TEYSSET C. DE LA TORRE F. and GAREL J-R. (2000). Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* upon aeration: involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 262-267.

Morales, R. (2002). "The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*." Thyme: the genus *Thymus*: 1-43.

Moroh, J.L.A., C. Bahi, K. Dje, Y.G. Loukou and F. Guede-guina, 2008. Study of the antibacterial activity of Morinda morindoides (Baker) milne-redheat (rubiacaceae) acetatic extract (ACE) on in-vitro growth of Escherichia coli strains. Bulletin Societe Royale des Sciences Liege, 77: 44-61.

NGOUNOU C., NDJOUENKEU R., MBOFUNG F. et NOUBI I. (2003). Mise en évidence de la biodisponibilité de calcium et du magnésium au cours de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé du Zébu. *Journal of Food Engineering*, 57,301-307.

Olivier G. Caractéristique et mode d'action des antibiotiques. 2007.

Özcan M. et Chalcha J. C. 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L growing wild in Turkey. *Bulgarian journal of plant physiology.*, 30(3-4) : 68-73.

Poletti A. (1988) Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. Delachaux & Niestlé S. A. Suisse. Pp : 103 et 131.

Références bibliographiques

Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein, 2003. Microbiologie. De Boeck-Supérieur., pp: 1137.

Quezel P. et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales *EdC.N.R.S.* Tome I. 565 p.

ROUSSEL Y., PEBAY M., GUEDON G., SIMONET J.P. and DECARISN B. (1994). Physical and genetic map of streptococcus thermophiles A054. *Journal of bacteriology*, 176(24): 7413-7422.

S. ROBERT , Notes de cours, Chimie organique 1, département de chimie-biologie, université de Québec, 1994. 27pp.

SCHMIDT J.L., TOURNEUR C. et LENOIR J. (1994). Fonction et choix des bactéries lactiques laitières in « bactéries lactiques» Vol II. DE ROISSART H. et LUQUET F.M.Ed. *Lorica*, paris. 37-46.

Sultana, B., F. Anwar and M. Ashraf, 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.*, 14: 2167-2180.

Takeuchi H., Lu Z. G. et Fujita T. 2004. New monoterpenes glycoside from the aerial parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L). *Bioscience, biotechnology and biochemistry.*, **68**(5) : 1113-1134.

TAMIME A. Y., KALAB M. and DAVIES G. (1984). Microstructure of set-style yoghurt manufactured from cow's milk fortified by various methods. *Food Microstructure.* 3: 83-92.

TAMIME A.Y and ROBINSON R.K (1999). Yogurt science and technology. 2nd ED. Cambridge: woodhead Publishing.

Zrihi, G.N., A.K.M. Kra and D.T. Etien, 2007. Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoce verticillata* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*. *Revue Méd. Pharm. Afr.*, 20: 9-17.

Résumé :

Ce travail a porté sur l'étude de l'effet des extraits au l'hexane de *Thymus vulgaris* récoltée dans la wilaya de Naama au sud d'Algérie sur les deux germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

L'extraction des composés bioactifs a été effectuée à partir de la partie aérienne de la plante .Les extraits obtenus ont été dilués à 20% ,40%,60%,80 et 100%.Les mesures et contrôles ont été réalisés en triples essais et concerné la méthode de contact direct, la méthode de diffusion sur disques, la CMI et la CMB.

Avec un taux de croissance qui recule et des diamètres d'inhibition qui deviennent de plus en plus importants en augmentant la concentration de l'extrait de thym ,on a pu d démontrer l'effet inhibiteur de ce dernier sur les germes étudiés qui est en relation certaine avec la concentration en composé bioactifs dans la plante de l'étude .

Par ailleurs, la CMI et CMB des deux souches (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) est obtenue avec l'extrait préparé à 60 %.

L'extrait au l' hexane de *Thymus vulgaris* de Naama semble exercer un effet de type bactéricide sur les deux germes spécifiques de yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Mots clés : *Thymus vulgaris* ; *Lactobacillus bulgaricus* ; *Streptococcus thermophilus* ; extrait ; activité antimicrobienne ; effet inhibiteur.

Abstract:

This study investigated the effect of ethanol extracts of *Thymus vulgaris* grown in the Naama region on the two specific germs of yogurt, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*.

The extraction of the bioactive compounds was carried out from the aerial part of the plant. The extracts obtained were diluted to 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. The measurements and controls were carried out in triple tests and concerned the direct contact method, the disk diffusion method, the MIC and the CMB.

With a growth rate that decreases and inhibition diameters that become increasingly important by increasing the concentration of the thyme extract, it was possible to demonstrate the inhibitory effect of the latter on the germs studied which is in relation with the concentration of bioactive compounds in the plant subject of the study.

Furthermore, the MIC and CMB of the two strains (*Streptococcus thermophilus* and *lactobacillus bulgaricus*) is obtained with extract prepared at 60%.

The ethanol extract of *Thymus vulgaris* of Naama seems to exert a bactericidal effect on the two specific germs of the yoghurt *streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*.

Key words: *Thymus vulgaris*; *streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus bulgaricus*; extract; antimicrobial activity; inhibitory effect.