



DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

M.BENAISSA Djaber.

M.MELLAL Salah.

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité: CONTROLE DE LA QUALITE DES ALIMENTS.

THÈME

Effets antimicrobiens de l'extrait au méthanol de *Thymus vulgaris* (Thym) récolté dans la région de Naama sur la croissance des germes spécifiques du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Soutenu publiquement le 21/ Juin /2017.

DEVANT LE JURY

Encadreur	M. AIT SAADA.D.	M.C.B	Université de Mostaganem.
Président	M. BOUDEROUA.K	Professeur	Université de Mostaganem.
Coencadreur	M ^{me} . AIT CHABANE.O	M.A.A	Université de Mostaganem.
Examineur	M. BEKADA.A	Professeur	Université de Tissemsilt.
Invité	M.HAROUN	Doctorant	Université de Mostaganem.

Année universitaire : 2016 – 2017.

PLAN.

Remerciement	A
Résumé	B
Liste des tableaux et figures	C
Liste des abréviations	D
Introduction	01

PARTIE 01 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

CHAPITRE I : Généralité sur le Thym	02
1. La plante <i>Thymus vulgaris</i>	02
2. Origine et distribution de la plante	02
3. Place de la plante dans la systématique	03
4. Description botanique de la plante	03
5. Composition chimique	04
6. Utilisations des feuilles de <i>Thymus vulgaris</i>	06
7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours	07
CHAPITRE II : Généralités sur les bactéries lactiques	09
1. Définition et caractéristiques généraux des bactéries lactiques	09
2. Classification des bactéries lactiques	10
2.1. Classification au niveau du genre	11
2.2. Identification et classification au niveau de l'espèce	13
2.2.1. Streptocoques et autres coques lactiques	14
2.2.2. Lactobacilles et autres bactéries lactiques	16
3. Métabolisme des bactéries lactiques	18
3.1. Processus métabolique	18
3.1.1 Métabolisme des sucres	19
3.1.3. La lipolyse	19
3.1.2. La protéolyse	20

4. Interaction chez les bactéries lactiques	20
4.1. Les interactions positives	21
4.2. Les interactions négatives	21
4.2.1. L'effet des différents acides organiques	21
4.2.2. L'effet de l'acidification	22
4.2.3. L'effet du peroxyde d'hydrogène	22
4.2.4. L'effet des antibiotiques	23
4.2.5. L'effet de bactériocines	23
5. Intérêt des bactéries lactiques en alimentation	24
6. Bactéries lactiques et santé humains	25

PARTIE 02 : METHODOLOGIE.

1. Objectifs	26
2. Région de traitement préliminaire de matière végétale	27
3. Extraction des composés bioactifs	27
4. Protocole expérimentale	28
4.1. Activation des inoculat microbiens	28
4.2. Méthode de contact direct	28
4.3. Méthode des disques par diffusion sur le gélose	28
4.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	29
4.5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide	30
5. Traitement statistique	30

PARTIE 03: Résultats et Discussion.

1. Résultats	31
1.1 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	31
1.1.1 Méthode de contact direct	31
1.1.2 Diamètre d'inhibition	32
1.1.3 Taux d'inhibition	33
1.1.4 Concentration Minimale Inhibitrice	33
1.1.5 Concentration Minimale Bactéricide	34
1.2 <i>Streptococcus termophilus</i>	35
1.2.1 Méthode de contact direct	35
1.2.2 Diamètre d'inhibition	36
1.2.3 Taux d'inhibition	37
1.2.4 Concentration Minimale Inhibitrice	37
1.2.5 Concentration Minimale Bactericide	38
2. Discussion	40
Conclusion et Perspectives	42

Références bibliographique

Annexe

Remerciements

Nous remercions notre créateur **Allah**, Grand et Miséricordieux, Le tout Puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à **Dr. AIT SAADA Djamel** qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans l'encadrement de ce mémoire.

Nous avons été satisfaits de sa qualité exceptionnelle d'un bon enseignant, merci de nous avoir guidés avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.

Nous ne pouvons que sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.

Nos remerciements sont adressés également aux membres du jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepté de juger ce modeste travail :

Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre profond respect à **Prof. BOUDAROUA.Kadour** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations, un grand merci pour tout ce que nous avons appris grâce à vous au cours de nos années de graduation, vous trouverez ici toutes nos expressions respectueuses et notre profonde gratitude.

Nous remercions vivement **Prof. BEKADA Ahmed** d'avoir eu l'amabilité de bien vouloir examiner ce travail, mais aussi pour tous ses efforts avec nous, nous étions tout le temps satisfaits de votre qualité exceptionnelle de bon enseignant.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés bioactifs et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes. Dans ce travail, on s'est intéressé aux effets antimicrobiens et antioxydants d'extrait de *Thymus vulgaris* plante largement utilisée en médecine traditionnelle aussi en industrie agroalimentaire à travers le monde.

L'extrait de *Thymus vulgaris* a été testé sur les souches lactiques spécifiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*), en employant la méthode de contact direct, la méthode des disques, détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice et Bactéricide.

Notre étude est se résume dans les points suivants :

- Extraction par macération des composés bioactifs d'extrait de *Thymus vulgaris* de la région de NAAMA au méthanol.
- Les effets inhibiteurs d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les bactéries lactiques spécifiques au yaourt.

Il résulte enfin, à partir des rapports CMB/CMI obtenus (1.333 et 1) pour le *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* respectivement, que l'extrait de *thymus vulgaris* exerce un effet inhibiteur de type bactéricide sur les deux souches étudiées.

Mots clés : *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, effets antimicrobiens, composés bioactifs, *Thymus vulgaris*.

Liste des figures :

Figure 1	Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris</i>	04
Figure 2	Voies métaboliques des bactéries lactiques	18
Figure 3	Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait <i>Thymus vulgaris</i> chez <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	34
Figure 4	Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait <i>Thymus vulgaris</i> sur le <i>Streptococcus thermophilus</i>	38

Liste des tableaux :

Tableau 1	Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> .	03
Tableau 2	Teneur en polyphénols dans l'infusion aqueuse du <i>Thymus vulgaris</i> .	05
Tableau 3	Les principaux flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> .	06
Tableau 4	Quelques caractéristiques des bactéries lactiques.	13
Tableau 5	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	31
Tableau 6	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des diamètres d'inhibition chez le <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	32
Tableau 7	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des taux d'inhibition chez le <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	33
Tableau 8	Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	34
Tableau 9	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> .	35
Tableau 10	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des diamètres d'inhibition chez le <i>Streptococcus thermophilus</i> .	36
Tableau 11	Effet des différentes dilutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des taux d'inhibition chez le <i>Streptococcus thermophilus</i> .	37
Tableau 12	Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> .	38
Tableau 13	Action inhibitrice d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance des bactéries lactiques.	39

Liste des abréviations :

BL	Bactérie lactique.
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> .
LB	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> .
UFC	Unité Forment Colonies par ml.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CMB	Concentration Minimale Bactéricide.
°C	Degré Celsius.
v	Volume.
S	Taux de survie du microorganisme en %.
di	La densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant incubation.
df	La densité optique dans la solution phénoliqueensemencée après incubation.
Di	La densité optique sans extrait de <i>Thymus vulgaris</i> avant incubation.
Df	La densité optique sans extrait de <i>Thymus vulgaris</i> après incubation.
MRS	Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.
MH	Muller Hinton.



Introduction

L'utilisation des plantes aromatiques par l'homme est une pratique antique (**Majinda et al. 2001**). De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, en tenant compte de leurs propriétés aromatiques d'assaisonnement des plats ou de remède très utilisé en médecine traditionnelle.

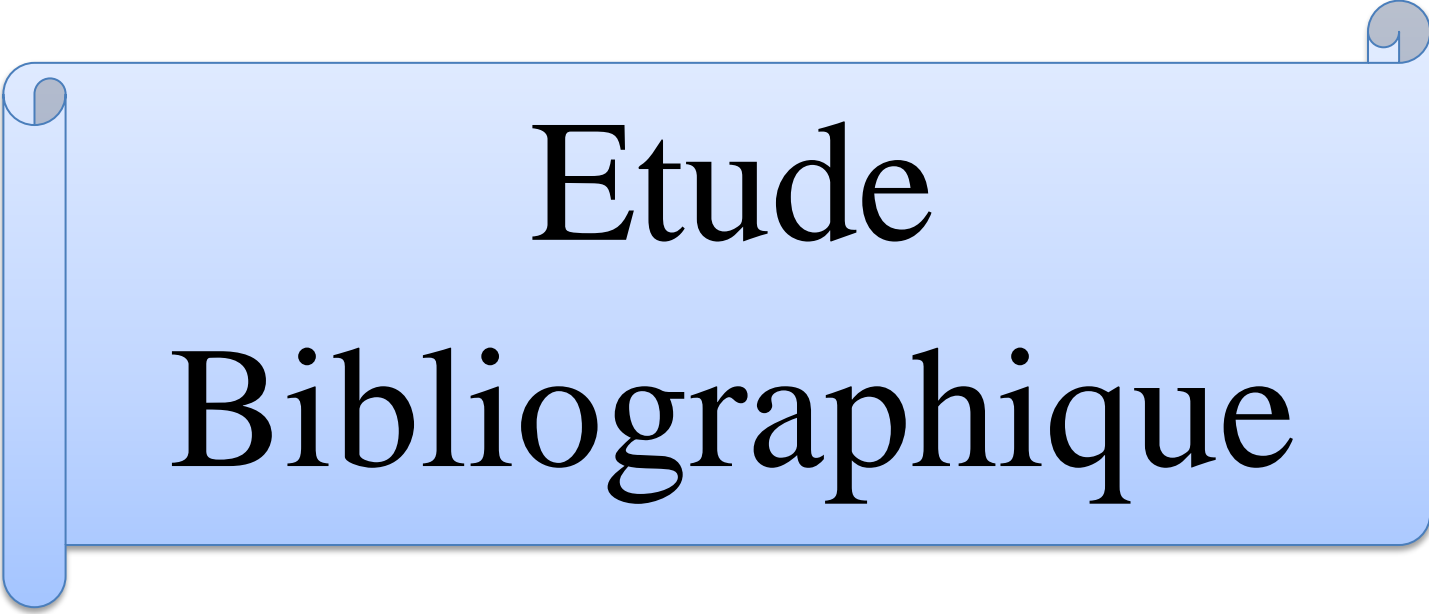
Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riche dans le monde, avec un nombre très élevé des plantes utilisées comme médicament, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies (**Majinda et al. 2001**).

L'importance économique des plantes aromatiques et médicinales du fait de leurs propriétés biologique, thérapeutiques, odoriférantes..., de leur impacte au niveau de l'environnement et de leurs multiples utilisations dans diverses industries, suscite un intérêt croissant en biologie et même en chimie organique; plus de la moitié de la population mondiale de ces plantes est retrouvée dans les pays en voies de développement.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre très importants d'aliments. Ces bactéries sont déjà reconnues par la production des acides organiques qui abaissent le pH des aliments ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production du CO₂ par les bactéries lactiques réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures (Desmazeaud., 1992).

En agroalimentaire, les bactéries lactiques sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et les qualités des produits alimentaires fermentés (lait fermentés, beurre, olive, choucroute, différents types de fromage, dans certains cas de charcuterie et dans l'ensilage) (Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Tailleux, 2001).

Ce travail vise à étudier les effets antimicrobiens et inhibiteurs de l'extrait au méthanol de *Thymus vulgaris* (Thym) récolté dans la région de Naama -Algérie- sur la croissance des germes spécifiques du yaourt *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.



Etude
Bibliographique

1. La plante *Thymus vulgaris* :

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales., 2002). Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris*. localement connu « *zaatar* ». En français et anglais par exemple, il est fréquemment employé le nom du genre (thym et thyme respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (Amiot., 2005).

Le nom «*Thymus*» dérive du mot grec « thymos » qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante., 2001). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin., 2001).

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Cette variation peut être quantitative ou qualitative. Un grand nombre d'espèces possèdent des individus dont les composés secondaires varient quantitativement d'un individu à un autre. Par contre, les exemples de variation qualitative, c'est-à-dire l'existence de chémotypes au sens strict dont les individus peuvent porter des molécules de nature chimique différentes les uns des autres, sont moins fréquents. C'est notamment le cas de *Thymus vulgaris* qui exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (exemples : thymol (T), carvacrol (C),...). (Amiot., 2005).

2. Origine et distribution de la plante :

Thymus vulgaris est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Özcan et Chalchat, 2004 ; 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 synthétisée dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification botanique de *Thymus vulgaris*.

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. Description botanique de la plante :

Thymus vulgaris est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur.

Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999; Morales, 2002) (**Figure 1**).

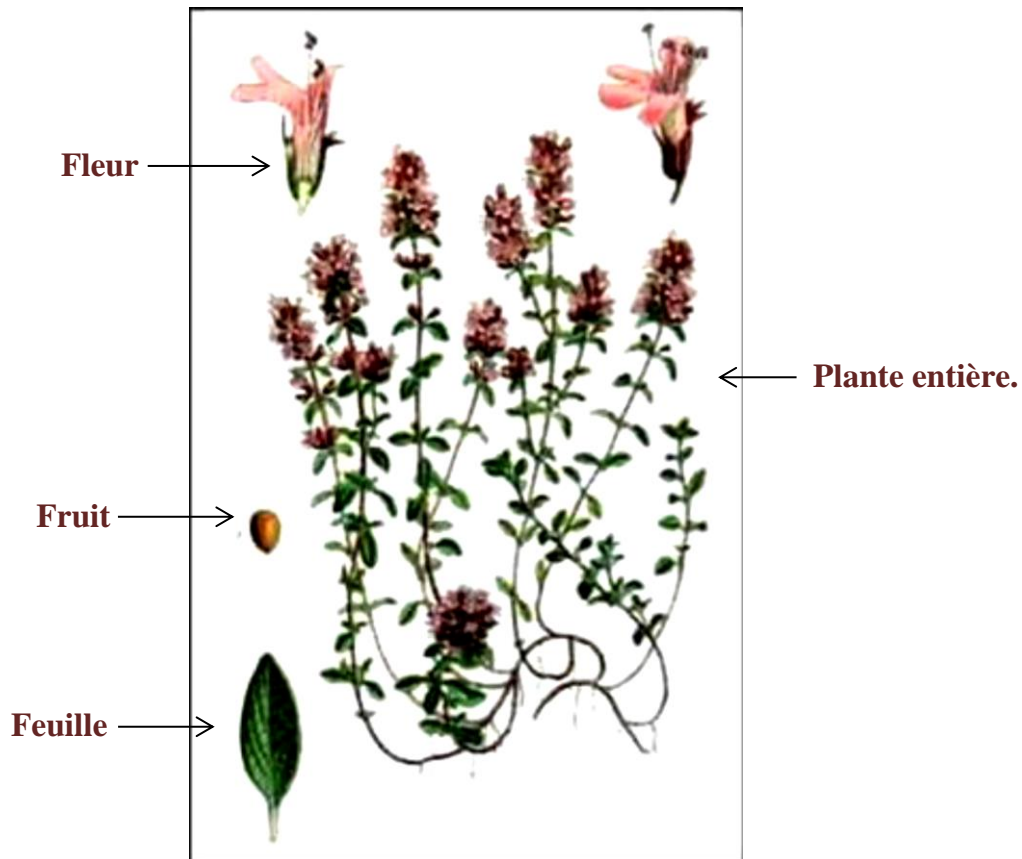


Figure 1. Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris*. (Iserin., 2001).

5. Composition chimique :

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intraspécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimiques (Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005).

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymène (9,1 - 18,5 %), γ -terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La

caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006).

Le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques (Kulišić et al., 2006). Le **tableau 2**, ci-dessous résume les résultats.

Tableau 2. Teneur en polyphénols (en µg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišić et al., 2006).

Plante	Phénols totaux	Flavonoïdes	Non- flavonoïdes	Catéchines	Anthocyanines
<i>Thymus vulgaris</i>	33.3	25.0	8.3	1.2	6.7

La méthodologie habituelle pour étudier les dérivés flavonoïdiques dans les plantes implique les extractions successives employant plus d'un solvant, plusieurs étapes de fractionnement et différentes techniques de chromatographie pour extraire, séparer, isoler, épurer et identifier les composés d'intérêt. Le **tableau 3** énumère les flavonoïdes trouvées dans les feuilles *Thymus vulgaris*, par plusieurs auteurs, en utilisant la méthodologie ci-dessus mentionné.

De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique, l'identification des composés polyphénoliques dans l'infusion aqueuse de *Thymus vulgaris* par analyse HPLC a montré une présence dominante d'acide rosmarinique (17,45 mg/g = 1,7 % de la masse sèche de *Thymus vulgaris*) et un autre composé significatif est l'eriocitrin (1,96 mg/g) (Kulišić et al., 2006).

D'autres composants ont été détectés seulement en traces, l'acide caféique (0,02 mg/g) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence de la vitamine E (α -tocophérol) (4,4 mg/Kg) (Guillén et Manzanos, 1998 ; Kulišić *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Les principaux flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* (Kulišić et al., 2006).

Flavonoïdes	Références
- Cirsilineol (5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Thymonine (5,6,4' - trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone)	Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Eriodictyol (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Sideritoflavone (5,3',4'-trihydroxy- 6,7,8- triméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Guillén et Manzanos, 1998
- 5-Desmethylnobiletine (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Guillén et Manzanos, 1998
- Apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Kulišić <i>et al.</i> , 2006
- Lutéoline (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Kulišić <i>et al.</i> , 2006
- Xanthomicrol (5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
- 5-Desmethylnobiletine (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
- Quercétine (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)	Morimitsu <i>et al.</i> , 1995 Kulišić <i>et al.</i> , 2006

6. Utilisation des feuilles de *Thymus vulgaris* :

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 (Adwan *et 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, des 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 a été employée en tant que bronchospasmodique, expectorant et antibactérien. On dit que la tisane de la feuille de *Thymus vulgaris* favorise le repos et le sommeil (Kitajima *et 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, en bain de bouche pour l'hygiène buccale (Poletti, 1988 ; Brunton, 1999) ainsi 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 Chalchat, 2004).

7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours :

Les propriétés pharmacologiques de la plante *Thymus vulgaris* et de ses différents extraits, en particulier l'huile essentielle et l'extrait aqueux, ont été bien étudiés. En plus de leurs nombreuses utilisations traditionnelles, la plante et ses extraits ont trouvé de nombreuses applications industrielles (principalement comme additifs alimentaires) et médicinales (Hudaib *et al.*, 2002).

Les recherches actuelles réalisées sur les effets des extraits de cette plante sur différents systèmes *in vitro* et *in vivo* ont ressorti plusieurs effets de grandes importances pour la médecine, la pharmacie et l'industrie moderne, parmi lesquelles on cite les plus importants :

a) Effets antioxydants

Thymus vulgaris se situait parmi les fines herbes séchées contenant les plus grandes capacités antioxydantes. Différents composés du thym lui permettent de posséder un tel statut, comme les phénols (thymol et carvacrol), les flavonoides, l'acide rosmarinique, l'acide caféique et la vitamine E (Kulišić *et al.*, 2006 ; Guillén et Manzanos, 1998). Ces constituants inhibent la peroxydation lipidique induite *in vitro* au niveau des mitochondries et des microsomes. Ils inhibent également partiellement la production de l'anion superoxyde (Bruneton, 1999).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été testée pour son activité antioxydante par deux méthodes différentes : la technique de décoloration de la β carotène et le test du DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl). Les résultats obtenus montrent que l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une grande activité antioxydante *in vitro* (Bouhdid *et al.*, 2006).

A côté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antioxydante importante, et les caractéristiques an-

tioxydantes observées n'étaient pas entièrement liées à la teneur en phénols de l'huile essentielle dans n'importe quelle méthode analytique, mais vraisemblablement fortement dépendantes de l'acide rosmarinique, composé phénolique principal dans l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* (Thuille *et al.*, 2003).

b) Effets antimicrobiens

Des similaires ont été obtenus par Ettayebi et ses collaborateurs (2000), qui ont montré que l'activité de l'huile du thym a été plus efficace contre les bactéries gram positive (*S. aureus*, *S. pyrogènes* et *S. pneumoniae*) que contre le gram négative (*E. coli* et autre). D'autre part ces mêmes auteurs ont trouvé que cette grande activité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est reliée au thymol qui est majoritaire de cette huile.

En outre, l'extrait organique entier de *Thymus vulgaris* est avéré être actif contre différentes souches bactériennes, alors que l'extrait aqueux indiquait la meilleure activité contre *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 3,5 mg/ml (Tabak *et al.*, 1996 ; Iserin, 2001). L'activité améliorée de l'extrait alcoolique du thym comparée à l'aqueux peut être expliquée par la présence du thymol, un phénol alkylique qui cause la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille *et al.*, 2003).

De même, 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).

c) Effet spasmolytique :

L'activité spasmolytique de *Thymus vulgaris* est le plus souvent attribuée aux phénols de l'huile essentielle. Beer et ses collaborateurs (2007) dans leur étude ont montré que l'effet spasmolytique du thymol est enregistré à la concentration de 10^{-6} M. A la concentration de 10^{-4} M le thymol inhibe à 100% l'activité contractile spontanée des muscles lisses de l'estomac du cobaye et à 10^{-5} M réduit les effets de l'acétyle choline à 35%. Ils supposent que le thymol a un effet analgésique par son action sur les récepteurs α_2 adrénergique des cellules de nerf.

Par ailleurs, Lemli et Van Den Brouke (Bruneton, 1999) ont montré que si les phénols de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* s'opposent effectivement aux contractions provoquées sur les muscles lisses du cobaye par l'histamine, l'acétyle choline ou d'autres réactifs, leur concentration dans les préparations aqueuses de la drogue est insuffisante pour justifier leur activité. Ces auteurs ont montré que l'activité spasmolytique de ces préparations est liée à la présence des polyméthoxyflavones.

1. Définition et caractéristiques généraux des bactéries lactiques :

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique ; mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (Larrent *et al.*, 1997 ; Bourgeois *et al.*, 1996)

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Ils sont distingués en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂ (Bourgeois *et al.*, 1996).

Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ; *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. (Klein *et al.*, 1998; Guiraud *et al.*, 2003 ; Axelsson, 2004; Limsowtin *et al.*, 2004).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, sur la peau, dans le système digestif, la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes. Elles survivent dans un milieu à faible aW, et résistent à l'éthanol (10 – 15 % éthanol) et au CO₂.

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH = 5 et parfois moins).

A ces pH, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agroalimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures (Nielsen *et al.*, 2008).

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire.

Chez certains industriels, le suivi de l'acidification est une garantie, quand la cinétique est correcte, d'un produit bien fait et sans développement de pathogènes. La croissance excessive des bactéries lactiques pourrait, par contre, être néfaste dans certains cas, en entraînant par exemple un sûrissement du goût du vin, de la bière, des viandes, du jus de fruit...) (Guiraud *et al.*, 2003).

2. Classification:

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen, elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001).

Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques, ...

D'après Ludwig *et al.* (2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes : *Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel de Bergey Trust (2008).

2.1. Classification au niveau du genre :

Les genres principaux de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein *et al.*, 1998). Dans le manuel de Bergey publié en 1957, les *Bifidobacterium* étaient répertoriées comme étant des *Lactobacillus bifidum*. Ces microorganismes, considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de GC (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/tactinobacteria.html>).

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé : les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus*. Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helocococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués. Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins *et al.*, 1993). En outre, la division cellulaire en deux directions perpendiculaires sur un seul plan (autrefois décrite incorrectement comme « divisée en deux plans », est utilisée comme la caractéristique clé dans la différenciation des coques. Les genres formant les tétrades sont les

Aerococcus, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* (Simpson *et al.*, 1995).

Une autre caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres de bactéries lactiques est le type fermentaire du glucose dans des conditions standardisées, c'est-à-dire avec des concentrations non limitées du glucose et de facteurs de croissance (acides aminés, vitamines et les précurseurs d'acide nucléique), et une disponibilité limitée en oxygène. Sous ces conditions, les bactéries lactiques se divisent en deux groupes : homofermentaire et hétérofermentaire. Dans la pratique, le test de production de gaz à partir du glucose permettra de discriminer les groupes.

Les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et un sous-groupe de *Lactobacillus* sont hétérofermentaires ; toutes les autres bactéries lactiques sont homofermentaires.

La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux. Les *Enterococcus* classiques croissent entre 10 °C et 45 °C, les *Lactococcus* et *Vagococcus* à 10 °C mais pas à 45 °C. En général, les *Streptococcus* ne se développent pas à 10 °C. Leur croissance à 45 °C dépend de l'espèce. La tolérance au sel peut également être utilisée pour différencier les *Enterococcus*, *Lactococcus/Vagococcus* et *Streptococcus*. Seul le genre *Tetragenococcus* tolère 18 % en NaCl. La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut également être utilisée. Les *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* peuvent se développer à des pH plus élevés que les autres bactéries lactiques. L'analyse de la composition en acides gras peut discriminer le genre *Vagococcus* avec les *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium*. Les *Pediococcus* peuvent être confondus avec les *Aerococcus* à cause de leur similarité morphologique. Toutefois, les *Pediococcus*, plus aérotolestants que les *Aerococcus*, et qui poussent bien en anaérobiose, sont en opposition avec la nature microaérophile des *Aerococcus*. (Collins *et al.*, 1991).

Cependant, il faut noter qu'il existe des recoupements entre les genres lactiques et le séquençage direct de l'ARNr 16S est considéré comme la méthode de classification la plus précise au niveau du genre.

2.2. Identification et classification au niveau de l'espèce

Comme indiqué ci-dessus, la classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne, synthétiser certaines enzymes... La composition en G+C de l'ADN, la

composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques. (Axelsson, 2004).

Tableau 4. Quelques caractéristiques des bactéries lactiques d'après (Axelsson, 2004).

caractéristiques	Bacilles				Coques							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de gaz	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	-	±	±	±	-	-
Croissance à 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	-	±	±	±	-	+	±
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	±	+	+	-	-	±
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D,L,DL	L	L	L	L	D	L,DL	L	L	L	D,DL

4(+ : positif ; - : négatif ; ± réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé).

2.2.1. Streptocoques et autres coques lactiques :

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus*. Ce sont des coques en paire ou en chaîne, Gram +, catalase (-), non sporulés, immobiles et anaérobies facultatifs. Historiquement, la différenciation sérologique de Lancefield était importante dans la classification des streptocoques. A l'heure actuelle, cette méthode est moins appréciée dans la classification mais elle reste toujours utile dans l'identification rapide de la plupart des bactéries pathogènes. Dans l'industrie alimentaire, certaines souches de *Streptococcus* et *Lactococcus* sont utilisées notamment comme agent d'acidification et de coagulation lactique en fromagerie, en salaison et dans la fabrication de yaourts.

a- *Streptococcus*:

Famille VI: *Streptococcaceae*.

Genre I: *Streptococcus*.

Le genre *Streptococcus sensu stricto* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques (hémolyse) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général, les streptocoques pyogènes sont α -hémolytiques tandis que les streptocoques oraux sont α - ou non-hémolytiques.

Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans*. Les caractéristiques biochimiques telles que : la fermentation des hydrates de carbones, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification. Les techniques fingerprinting génétiques telles que RFLP, REP-PCR, RAPD-PCR, DGGE-PCR et SDS-PAGE sont également utilisées pour identifier et classer les streptocoques (Desar *et al.*, 2008 ; Koort *et al.*, 2006 ; Piraino *et al.*, 2006 ; Rossetti *et al.*, 2005 ; Furet *et al.*, 2004 ; Rantsiou *et al.*, 2004).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbrückii* ssp *bulgaricus*) impliquée (et obligatoire) pour la dénomination yaourt en législation française et pour certains fromages. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » (Scheilfer, 1987) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp. salivarius* (Haddie *et al.*, 1995). Une troisième espèce, *Sp. Vestibularis* appartient également au groupe des streptocoques (Kawamura *et al.*, 1995). La résistance à la température, la capacité à croître à 52 °C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *Sp. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie *et al.*, 1986).

b- Lactococcus:

Famille VI : *Streptococcaceae*.

Genre II : *Lactococcus*.

Les lactocoques sont étroitement associés aux produits laitiers, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière (Teubet *et al.*, 1995). Les *Lc. garviae* sont souvent associés à la mastite bovine et à la lactococcose des poissons. Trois sous-espèces de *Lc. lactis* peuvent être distinguées : *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* et *Lc. lactis* subsp. *hordniae*. Seules les deux premières sont importantes dans la fabrication des produits laitiers. Les *Lc. lactis* subsp. *lactis* incluent les espèces qui étaient autrefois désignées *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* et *Lactobacillus xylosus* (Schleifer *et al.*, 1987). Le groupe *Lc lactis* ssp. *cremosis* comporte les espèces précédemment désignées *Streptococcus cremoris* ou *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* qui se différencient de *Lc. lactis* subsp. *lactis* par l'incapacité à croître à 40 °C mais peuvent se développer dans un milieu à 4 % NaCl, peuvent hydrolyser l'arginine et fermenter le ribose. Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *Lc. lactis* sont également séparées par les études d'homologie ADN – ADN et de comparaison des séquences des ARNr 16S. Les caractéristiques biochimiques (par exemple l'utilisation des sucres) peuvent être utilisées pour distinguer les espèces de lactocoques ainsi que les méthodes génétiques (Axelsson *et al.*, 2004).

2.2.2. Lactobacilles et autres coques lactiques :

➤ *Lactobacillus* :

Famille I: *Lactococcaceae*..

Genre I : *Lactobacillus*.

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrés comme contaminants.

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, non sporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase (-) (certains ont une pseudo- catalase mais sont benzidine (-), micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ en plus de l'acide lactique.

Les lactobacilles homofermentaires stricts (par exemple les *Lb. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (par exemple les *Lb. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses ; les pentoses et le gluconate sont fermentés par l'intermédiaire de ce dernier. Les hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses. Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en acides aminés, en vitamines et en acides gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques.

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen (1919) en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel.

a. Groupe I ou "*Thermobacterium*":

Il comprend les lactobacilles homofermentaires stricts, la plupart étant thermophiles, qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages par exemple) sont *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. leichamni*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. kefirifaciens*, Adapté de (Kandler et al, 1986).

b. Groupe II ou "*Streptobacterium*":

Il regroupe les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles qui se développent à 15°C. Ces bactéries fermentent les pentoses par la voie hétérofermentaire et les hexoses par la voie homofermentaire. Il comporte les *Lb. casei* qui sont les lactobacilles prédominants du lait, les *Lb.*

plantarum rencontrés dans la choucroute, les *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. acetotolerans*, *Lb. graminis*, *Lb. rhamnosus*,...présents dans diverses matrices alimentaires végétales et animales.

c. Groupe III ou "Betabacterium":

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. sanfrancisco*,...

Ces lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont les agents de sùrissement. Ils ne sont jamais pathogènes. Dans les viandes, ils provoquent le verdissement par action de l'H₂O₂ qui transforme l'hémoglobine en choléglobine, ou de l'H₂S qui forme de la sulfomyoglobine. Dans les produits conservés par des acides, *Lactobacillus acetotolerant* et les autres lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* ou *Lb. fructivorans*) peuvent résister et causer des altérations. Dans le cas de l'altération du vin, les *Lactobacillus* ont souvent été incriminés, en particulier les *Lb. hilgardii*, identifiés comme la cause majeure de l'altération (Guiraud *et al.*, 2003).

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie, fromagerie, charcuterie, dans la fabrication de la choucroute, ...). Dans les yaourts, les *Lb. bulgaricus* forment des peptides utilisés ensuite par les *Streptococcus thermophilus*.

L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de la thréonine par l'aldolase de *Lb. bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*,...) interviennent pendant l'affinage des fromages. Les *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. bulgaricus* agissent avec les *Streptococcus thermophilus* dans les fromages à pâte cuite. A propos du kéfir, les *Lactobacillus kéfir*, *Lb. kefiranofaciens* et les autres lactobacilles mésophiles ont démontrés leur contribution à la fabrication du produit.

Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisin, choucroute, cornichon,...) (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Rodas *et al.*, 2005 ; Edwards *et al.*, 2000).

3. Métabolisme des bactéries lactiques:

3.1. Processus métabolique:

Le métabolisme d'une cellule vivante est l'ensemble des réactions de dégradations et d'échange avec le milieu environnement (figure 2) pour assurer sa croissance et sa reproduction. (Catabolisme) et de synthèses (anabolisme) permettant d'établir un cycle.

Puisque la cellule vivante obéit au premier principe de thermodynamique (conservation de l'énergie), l'énergie produite par les réactions de dégradation du substrat compense l'énergie consommée par les réactions de synthèse des constituants cellulaires ; il y a donc couplage énergétique entre les réactions anaboliques et cataboliques.

En réalité ces réactions peuvent être encore plus étroitement liées : par exemple, des réactions cataboliques peuvent à la fois produire de l'énergie et être à l'origine de métabolites (sucre, nucléotides, acides aminés, acides gras) entrant dans les réactions anaboliques de biosynthèse (Thompson et Gentry –Weeks, 1994).

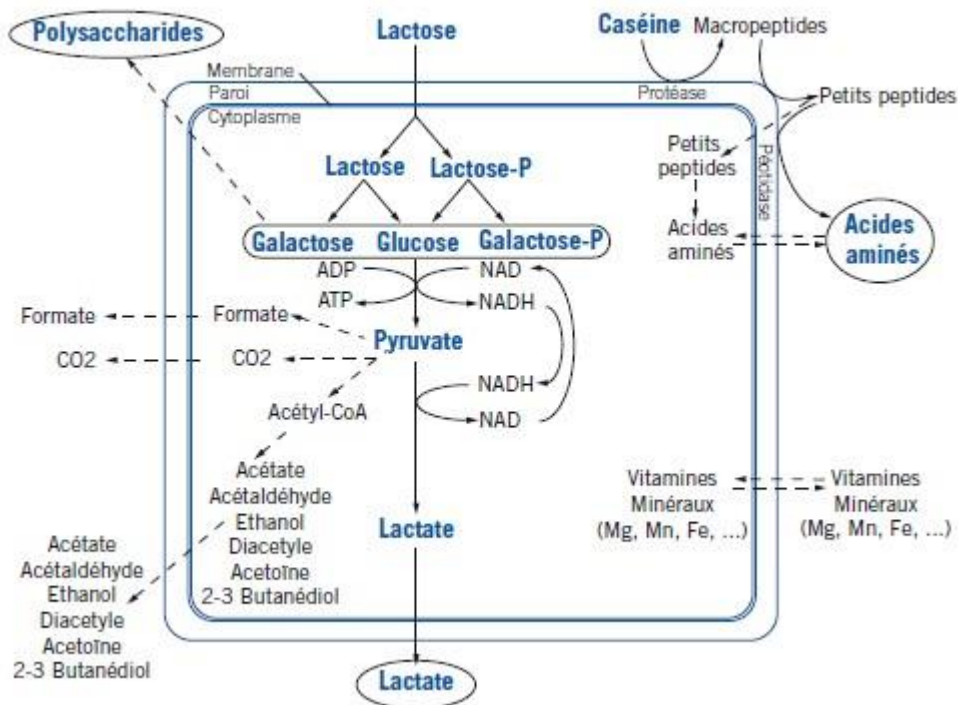


Figure 2. Voies métaboliques des bactéries lactiques
(Thompson et Gentry –Weeks, 1994).

3.1.1. Métabolisme des sucres:

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait, disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%.

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoénol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule, les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies; la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (Desmazeaud, 1983).

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres .

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages. Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (McSweeney et Sousa, 2000).

3.1.2. La Lipolyse:

Relativement faible chez les ferments lactiques, l'activité lipasique contribue à l'élaboration de la flaveur des fromages lors de la maturation (Oison, 1990; Kamaly et Marth, 1989).

L'hydrolyse des triglycérides est la transformation biochimique principale du gras fromager pendant la maturation et conduit à la formation des acides gras libres, mono et diglycérides et probablement du glycérol (Singh *et ai*, 2003). Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de métylcétones, alcools, lactones et esters (McSweeney et Sousa, 2000).

3.1.3. La protéolyse :

Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, les protéases indigènes du lait (la plasmine) et les enzymes du ferment et de la flore secondaire (Lane et Fox, 1997). La protéolyse est considérée comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère.

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997; Kamaly et Marth 1989). Ces systèmes sont complexes de par le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de par leur localisation cellulaire.

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Kamaly et Marth, 1989). Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (Lynch *et al.*, 1997; Lane et Fox, 1996; Farkye *et al.*, 1995).

Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés, caractéristique variable selon les souches. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (Yvon et Rijnen, 2001).

4. Interaction chez les bactéries lactiques :

Les interactions entre les micro-organismes associés peuvent être bénéfiques pour l'un des micro-organismes ou pour les deux, c'est le cas d'une symbiose ou de coopération entre les deux micro-organismes. Si aucun effet n'apparaît, alors on considère que les deux micro-organismes se développent indépendamment l'un de l'autre. Si elles sont néfastes pour l'un des deux microorganismes, on parle d'inhibition.

4.1. Les interactions positives:

L'interaction positive se traduit par une stimulation ou coopération due à la production de nutriments azotés et à une modification des conditions physiologiques. Ex: la proto-coopération entre *Sc. thermophilus* et *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

4.2. Les interactions negatives:

Elles se traduisent par une inhibition due à une production de divers composés bactéricides, telle que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacetyl et les bactériocines (Juillard *et al*, 1987).

4.2.1. L'effet des différents acides organiques :

L'inhibition due à la production d'acides organiques, résulte de l'abaissement du pH et aussi de l'effet inhibiteur spécifique des acides (Parente *et al* 1994).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule ou elle s'ionise ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport.

Dans le cas de l'acide lactique, les concentrations en acide non dissocié nécessaire pour provoquer une inhibition serait pour les levures, les *Entérobacteriaceae* et les *micrococaceae* de l'ordre 1mMole pour les moisissures, de 3mMole pour les bacillaceae (Baird Parker , 1980). Une souche de *pseudomonas putida* a été inhibée à pH 5,3 en présence de l'acide lactique totale (4,1 mM d'acide non dissocié) (Biliard, 1990).

Les mécanismes d'action de l'acide lactique dans la cellule ne sont pas élucidés. L'acidification du milieu intracellulaire et la modification du potentiel rédox, résultant de l'accumulation de lactate dans la cellule, perturberaient le métabolisme.

Les bactéries hétérofermentaires peuvent produire des quantités notables d'acide organique autre que l'acide lactique. Les *leuconostocs*, les *lactobacilles*, hétérofermentaires produisent autant d'acétate (Kandler, 1983). Or, l'acide acétique est fortement inhibiteur pour les nombreux micro-organismes et la présence simultanée d'acide lactique pourrait avoir un léger effet de synergie.

4.2.2. L'effet de acidification:

Les bactéries nocives et pathogènes ne peuvent pas se développer dans un environnement acide. Ainsi le pH minimum de croissance peut varier d'une bactérie à une autre. Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la concentration en substrat fermentescible. Elles sont limitées par le pouvoir tampon du milieu et par le pH minimum toléré par les ferments. Le pH atteint dans certains de ces produits (yaourt, pH:4; saucisson sec, pH 4,5 à 5,3) suffit à éliminer certains contaminants.

Desmazeaud (1983) a montré que la production de l'acide lactique par les bactéries lactiques au cours de la croissance est la cause la plus importante de la diminution du pH ; cet acide lactique se trouve en solution à l'état suivant :



Si le milieu est acide la forme moléculaire est dominante en milieu alcalin ou neutre ; la forme ionisée est quantitative peut plus importante. Juillard *et al.* (1987) ont montré que si le pH n'est pas maintenu constant, c'est l'ion H_3O^+ qui est l'inhibiteur, et si le pH est régulé à pH= 6, l'ion $\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$ sera présent en quantité plus importante.

4.2.3. L'effet du peroxyde d'hydrogène:

Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important pour les bactéries en les protégeant de la toxicité de l'oxygène. Accumulé dans la cellule, à la concentration de 10-15Mm cet élément est fonctionnellement comparable au superoxyde dismutase qui décompose les supéroxydes.

Il est prouvé que le H_2O_2 peut s'accumuler et devenir inhibiteur pour quelques micro-organismes (Condon, 1987). Cette accumulation résulte d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation. Le peroxyde d'hydrogène peut aussi activer le système lactoperoxydase avec la formation de l'hypothiocyanate et d'autres antimicrobiens (De Vuyst et Vandamme, 1994).

L'ion hypothiocyanate est un très puissant antimicrobien qui agit aussi bien sur les bactéries gram positives que sur les bactéries gram négative. Cependant, à cause de la capacité des autres systèmes enzymatiques tels que flavoprotéine et peroxydase pour décomposer le H_2O_2 , il n'est pas clair pourquoi la contribution in vivo du H_2O_2 est une activité antimicrobienne (Nagy *et al* 1991).

4.2.4. L'effet des antibiotiques:

Lorsqu'un antagonisme induit par des cultures bactériennes ne peut être attribué aux acides organiques, aux peroxydes d'hydrogène ou aux bactériocines, on attribue généralement à un antibiotique. Le seul composé qui ait été correctement purifié et caractérisé est la reutéline (Michel *et al*, 2000). Cette inhibition à large spectre d'activité antimicrobienne est produite par *Lactobacillus reuteri*, en présence de glycérol. La reutéline se présente comme un mélange de monomère, de monomère hydraté et dimère cyclique du 3- hydroxy-propionaldehyde.

Ce composé peut interférer avec la ribonucléotide-réductase, enzyme universelle impliquée dans la synthèse d'ADN, expliquant son large spectre d'activité, ainsi que son effet auto inhibiteur. La synthèse de la reutéline a lieu lorsque le glycérol est utilisé comme accepteur d'électrons par *Lb. reuteri*. Il a été démontré que la reutélicycline inhibe *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeria innocua*. Elle n'a aucun effet sur les bactéries gram négatives (Michel *et al*, 2000).

4.2.5. L'effet de bactériocines :

Une récente définition des bactériocines produites par les bactéries lactiques suggère qu'elles doivent être considérées comme un produit modifiant la synthèse ribosomale bactérienne qui peut avoir un spectre d'activité relativement étroit Caplice et Fitzgerald, (1999). Ces substances ont été caractérisées comme étant des molécules de nature protéique ou des protéines complexes (lipoprotéine, glycoprotéine). Ces bactériocines ont un spectre d'activité inhibiteur limité aux souches phylogénétiquement proche du producteur. L'avantage des bactériocines sur les antibiotiques classiques est que les enzymes les détruisent facilement (Caplice et Fitzgerald, 1999).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens actifs sur des germes Gram positive, taxonomiquement proches. De nombreuses bactéries lactiques en produisent. Cependant, leur spectre, leur composition et leur mode d'action restent très hétérogènes. La nisine, produite par un *Lactococcus lactis* se distingue par son activité sur de nombreuses bactéries Gram + (Park *et al.*, 2003; Noonparkdee., 2003). Les scientifiques les classent en trois catégories. Les antibiotiques (nisine) comportent moins de 50 acides aminés dont certains (lanthionine, deshydroalanine), modifiés par les bactéries, confèrent une structure et une activité caractéristiques. La diplococcine

appartient au second groupe, caractérisé également par un bas poids moléculaire mais par l'absence de lanthionine. La petite taille de ces substances implique une bonne attitude à l'acidification.

5. Intérêt des bactéries lactiques en alimentation :

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

Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons.

Nul besoin d'explication scientifique pour de nombreux peuples qui, depuis des milliers d'années, se servent des bactéries lactique pour produire des aliments. Ils en améliorent ainsi la conservation, et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état original.

Aujourd'hui, les " bons amis " probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Leur " fabrication " implique une fermentation, processus microbien par lequel le lactose (le sucre du lait) est transformé en acide lactique. En s'accumulant dans le lait, l'acide lactique modifie les protéines et, par conséquent, la texture du lait. Les qualités et les aspects particuliers qui caractérisent les différents produits sont dus à d'autres variables telles que la température ou la composition du lait.

C'est l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique. D'autres sous-produits des bactéries lactiques donnent saveurs et arômes supplémentaires. Par exemple, l'acétaldéhyde donne au yaourt son arôme si caractéristique ; le diacétyl donne une saveur crémeuse à d'autres laitages fermentés.

On peut rajouter aux cultures d'autres micro-organismes, comme la levure lactique, pour leur donner des saveurs uniques. Par exemple, l'alcool et le CO₂ produits par la levure lactique contribuent au goût mousseux si rafraîchissant du kéfir, du koumiss et du leben. D'autres techniques qui consistent à enlever

le petit-lait ou à ajouter des saveurs différentes servent aussi à créer une gamme de produits très variés qu'on trouve sur le marché.

Le yaourt est le résultat de la symbiose de deux types de bactéries lactiques qui répondent au doux nom de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Chacune des deux bactéries stimule la croissance de l'autre. Ce lien symbiotique donne un produit différent des produits obtenus par les bactéries simples, prises séparément. Grâce à la symbiose des deux bactéries, la fermentation a lieu plus rapidement que s'il n'y avait qu'une seule espèce de bactérie.

Le yaourt et d'autres laitages fermentés nous donnent l'occasion de nous servir des bactéries lactiques comme de cultures probiotiques. Les cultures probiotiques favorisent le bon fonctionnement de notre flore intestinale. Le marché mondial de ces produits se développe de plus en plus, pour répondre aux besoins d'un public de plus en plus à l'écoute de sa forme et de sa santé.

6. Bactéries lactiques et santé humaine :

Dans le domaine de la santé , certains bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire les microorganismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animale exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisés sont *Lb.Acidophilus*, *Lb.casei* , *Lb.johnsonii*, *Lb.reuteri*, *Lb.delbruecki*, *subs bulgaricus*. (Salminen et al., 2004).

Les souches lactiques sont également utilisés dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiale chez le nourrisson, des propriétés anticancérogènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre les *clostridium difficile* et *helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .



Méthodologie

1. Objectifs :

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes ayant des vertus thérapeutiques dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie. 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 plante comme adjuvant dans certains produits laitiers (tels les yaourts 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) » ?

Pour cela, nous nous sommes réalisés une ensemble des essais afin de connaître le comportement *in vitro* des souches de levains lactiques vis-à-vis des inhibiteurs de croissance tels les polyphénols, les flavonoïdes et bien d'autres composés bioactifs contenues dans l'une des plantes autochtones poussant à l'état sauvage dans certaines régions du pays et très largement utilisée en médecine traditionnelle par la population à savoir le **Thym** (*Thymus vulgaris*).

D'une façon générale les objectifs escomptés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de 2 points essentiels :

1- Procéder à une extraction des principaux composés bioactifs de la plante par usage d'un solvant polaire à savoir le Méthanol.

2- Suivre les effets antimicrobiens de l'extrait au méthanol de *Thymus vulgaris* sur les germes *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 méthanol comme solvant d'extraction sur ces deux germes spécifiques du yaourt.

2. Région de prélèvement et traitements préliminaires du matériel végétal :

Le matériel végétal objet de l'étude le **Thym** (*Thymus vulgaris*) a été prélevé le mois de Mars 2017, dans la Wilaya de Naama au sud d'Algérie. Un échantillon de 2 à 3 kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce étudiée a été récolté d'une manière aléatoire dans la région de Mechria -NAAMA- relevant de la Wilaya de l'étude. La matière végétale a été ensuite étalée 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.

3. Extraction des composés bioactifs :

Selon Almas et Al-Bagieh (1999) et Almas (2001), les extraits à l'eau arrivent à agir en général sur la croissance de certaines bactéries appartenant au genre *Streptococcus* à des taux d'extractions de 5g/100ml de matière végétale de Kikar (*Acacia arabica*) provenant du Pakistan et de l'Arak (*Salvadora persica*) d'Arabie Saoudite.

Pour l'extraction des principaux composés bioactifs tels les polyphénols contenus dans la *Thymus vulgaris* on a opté pour l'utilisation d'une 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 sera réalisée par usage de Méthanol comme solvant d'extraction. Elle sera effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g en triples répétitions de matière végétale broyée. Chaque échantillon de broyat de matière végétale sera mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau, v / v). L'extraction par macération à froid de chaque mélange sera laissée ensuite se poursuivre pendant 6 heures à température ambiante sous agitation. La durée de l'extraction favorisera ainsi la dépolymérisation des principaux composés constitutifs de la plante tels que la lignine ainsi que les substances pectiques et permet une meilleure solubilisation des principaux composés bioactifs.

Les extraits hydro alcooliques obtenus seront filtrées en utilisant un papier filtre Whatman ayant une porosité de 0,2µm et débarrassés des solvants par évaporation sous vide à 45 °C.

Les extraits purs riches en composés bioactifs récupérés seront enfin dilués à l'eau distillée stérile à des taux variables de 0, 20, 40, 60, 80 et 100% (Extrait pur), respectivement.

4. Protocole expérimentale :

4.1. Activation des inocula microbiens :

L'étude concerne les deux souches pures de références et spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Chaque espèce lactique a été tout d'abord activée avant son utilisation expérimentale. Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée conservée au froid à 4 °C est au préalable ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37°C durant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution constituant la solution mère a été pris pour être ensemencée en surface d'une boîte de Pétri 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.

4.2. Méthode de contact direct (Bourgeois et Leveau, 1980):

Une colonie issue d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée comme préalablement sur milieu solide gélosé spécifique a été prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, chacune a été 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 sont effectuées ; allant à 10^{-4} pour respectivement les *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus bulgaricus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale seront 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 boîtes 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 a été effectuée après incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures (Bourgeois et Leveau., 1980).

4.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose :

Les disques sont confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination 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 constitue la solution mère. Des prises de volume de 1ml de cette dernière solution sont 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, sont 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 est faite 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).

4.4 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 obtenus par extraction aux différents solvants 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* prélevée à l'aide d'une anse à platine dans 10 ml de bouillon nutritif a été incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir les inocula. 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 séparément chaque extrait préparé 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 a été 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 sera égale à d_f ($d_i = d_f$).

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

$$S = \frac{d_f - d_i}{D_f - D_i} \times 100.$$

-**S** : Taux de survie du microorganisme en %.

-**df-di** : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.

-**Df-Di** : différence de densité optique sans extraits de *Thymus vulgaris* et après incubation à 37°C durant 18 heures (Kra et al., 2001 ; Zrihi et al., 2007).

4.5 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 estensemencée 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, égalementensemencé 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. Traitement statistique :

Les résultats paramétriques vont être traités statistiquement par une analyse de variance monofactorielle en randomisation totale suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS (Stat Box 6.4).



Résultats
&
Discussion

1. Résultats:

1.1. *Lactobacillus bulgaricus* :

1.1.1. Méthode de contact direct.

L'extrait de *Thymus vulgaris* préparé à 20% et 40% représente un développement important de *Lactobacillus bulgaricus* (93.10^4 et 89.10^4) UFC/ml respectivement.

Toutefois, en comparant ces dernières valeurs avec le témoin à base d'eau distillé les taux ($p < 0.01$) de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* s'avérant faibles ($p < 0.01$) (93.10^4 et 89.10^4 vs 133.10^4) UFC/ml.

La prolifération de ce microorganisme continue à diminuer en présence d'extrait de *Thymus vulgaris* à 60% arrive jusqu'à 59.10^4 UFC/ml. Par ailleurs, les solutions d'extrait préparé à 80% et 100% ont exercé une action bactéricide sur le *Lactobacillus bulgaricus*. (**Tableau 5**).

Tableau 5. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Nombre de colonies (UFC/ml).	Groupes homogènes				Analyse de variance
0%	133.10^4	a				** (P<0.01)
20%	93.10^4		b			** (P<0.01)
40%	89.10^4		b			** (P<0.01)
60%	59.10^4			c		** (P<0.01)
80%	0				d	** (P<0.01)
100%	0				d	** (P<0.01)

** : Effet hautement significatif, \bar{X} : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonies; a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens.

1.1.2. Diamètre d'inhibition :

Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu chez *Lactobacillus bulgaricus* avec l'extrait de *Thymus vulgaris* préparé à 100%; 10 mm en moyenne. Au contraire, les plus faibles résultats sont réalisées en présence des extraits dilués à (20, 40, 60, 80) % ;(5; 7,667; 8,66 ; 9,0) mm en moyenne respectivement.

Par ailleurs, la pénicilline enregistre le meilleur diamètre d'inhibition (14 mm en moyenne) par comparaison aux différentes solutions d'extraits expérimentaux. (**Tableau 6**).

Tableau 6. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez le *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes homogènes				Analyse de variance
Pénicilline.	14	1	a				** (P<0.01)
100%	10	1		b			** (P<0.01)
80%	9	1		b	c		** (P<0.01)
60%	8,667	0.577		b	c		** (P<0.01)
40%	7,667	0.577		b	c		** (P<0.01)
20%	5	4.359			c		** (P<0.01)
0%	0	0				d	** (P<0.01)

** : Effet hautement significatif, \bar{X} : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonies; a, b, c, d : Groupes homogènes de comparaison statistique des moyennes deux à deux.

1.1.3. Taux d'inhibition :

La variation du niveau d'inhibition des extraits de Thym chez *Lactobacillus bulgaricus* est marquée tous d'abord par de fort taux d'inhibition allant de (71,429; 64,286; 61,90; à 54,762) % respectivement pour l'extrait de *Thymus vulgaris* préparés à (100, 80, 60, 40)% successivement. Par contre, les faibles taux d'inhibition sont constatés à 20% d'extrait de *Thymus vulgaris* ; avec une valeur de l'ordre de 35,714%. (**Tableau 7**).

Tableau 7. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez le *Lactobacillus bulgaricus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Taux d'inhibition. (%)	Ecart type	Groupes homogènes				Analyse de variance
Pénicilline.	100	0	a				** (P<0.01)
100%	71,429	7.143		b			** (P<0.01)
80%	64,286	7.143		b			** (P<0.01)
60%	61,905	4.124		b			** (P<0.01)
40%	54,762	4.124		b	c		** (P<0.01)
20%	35,714	31.135			c		** (P<0.01)
0%	0	0				d	** (P<0.01)


** : Effet hautement significatif, \bar{X} : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonies; a, b, c, d : Groupes homogènes de comparaison statistique des moyennes deux à deux.

1.1.4. Concentration Minimale Inhibitrice : CMI.

L'extrait de thymus vulgaris préparé à 40% laisse un taux de survie de *Lactobacillus bulgaricus* d'environ 72% ; alors qu'à des taux d'extrait de *Thymus vulgaris* supérieurs, ce microorganisme s'avère incapable de survivre après 24 heures d'incubation à 37°C.

C'est à partir d'extrait préparé à 60% que la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* s'annule de manière absolue ; cette concentration est retenue comme étant la concentration minimale inhibitrice (CMI). (**Tableau 8**).

Tableau 8. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

LB	Témoin 0%	20%	40%	60%	80%	100%
di	0,021	1,732	1,815	2,003	2,224	2,317
df	0,221	1,909	1,959	1,929	2,201	2,161
df-di	0,2	0,177	0,144	-0,074	-0,023	-0,156
Df-Di	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
S (%)	100	88,5	72	0	0	0
CMI	 CMI= 60%					

df-di : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures ; Df-Di : différence de densité optique sans extraits de *Thymus vulgaris* et après incubation à 37°C durant 18 heures S : Taux de survie du microorganisme en %.

1.1.5. Concentration Minimale Bactéricide : CMB.

A travers la (figure 3) il apparait que l'extrait préparé à 60% n'a pas inhibé totalement la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*. Cependant, l'extrait à 80% engendre un pourcentage de survi proche de 0.01 de l'espèce microbienne expérimentale ; cette solution à base d'extrait de *Thymus vulgaris* constitue donc la concentration minimale bactéricide (CMB)

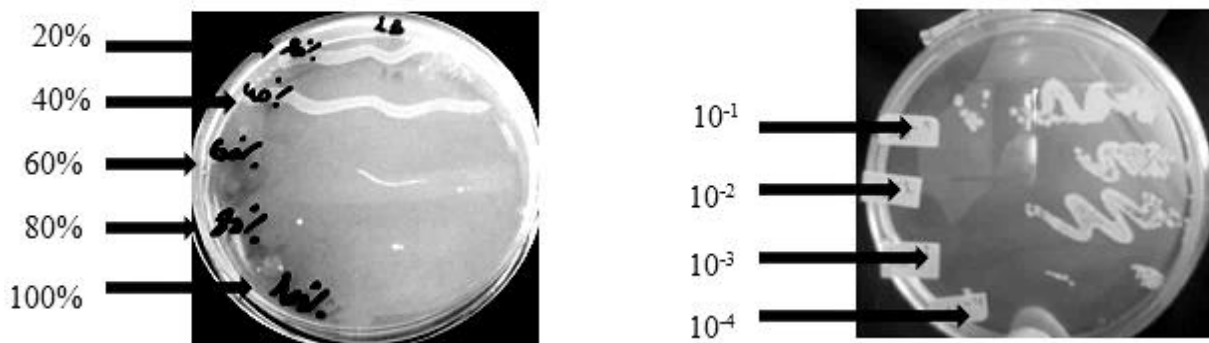


Figure 3. Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait *Thymus vulgaris* chez *Lactobacillus bulgaricus*.

1.2. *Streptococcus thermophilus* :

1.2.1. Méthode de contact direct.

L'extrait au méthanol de *Thymus vulgaris* préparé à 20 et 40% représente un faible taux de croissance de *Streptococcus thermophilus* (111.10^4 et 92.10^4) UFC/ml par rapport à celui du témoin à base de l'eau distillée stérile (140.10^4 UFC/ml).

La prolifération de ce microorganisme continue à diminuer en présence d'extrait de *Thymus vulgaris* à 60% arrive jusqu'à 53.10^4 UFC/ml. Par ailleurs, les solutions d'extrait préparé à 80% et 100% ont exercé une action bactéricide sur le germe *Streptococcus thermophilus* ; ainsi aucun développement de cette espèce n'a été observé. (**Tableau 9**).

Tableau 9. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Nombre de colonies (UFC/ml).	Groupes homogènes					Analyse de variance
0%	140.10^4	a					** (P<0.01)
20%	111.10^4		b				** (P<0.01)
40%	92.10^4			c			** (P<0.01)
60%	53.10^4				d		** (P<0.01)
80%	0					e	** (P<0.01)
100%	0					e	** (P<0.01)

** : Effet hautement significatif, X : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonie, a, b, c, d : Comparaison statistique des moyens.

1.2.2. Diamètre d'inhibition :

Le diamètre d'inhibition le plus remarquable chez *Streptococcus thermophilus* est réalisé avec l'extrait de *thymus vulgaris* préparé à 100% ; 10.33 mm, en moyenne. Au contraire, les plus faibles résultats sont réalisées en présence des extraits dilués à 20, 40, 60,80% 4,333 vs 6,667 ; 9 vs 10,333 mm, en moyenne.

Par ailleurs, la pénicilline à enregistré le meilleur diamètre d'inhibition (13.667 mm en moyenne) chez *Streptococcus thermophilus*. (**Tableau 10**).

Tableau 10. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes homogènes				Analyse de variance
Pénicilline.	13,667	0.577	a				** (P<0.01)
100%	10.333	0.577	a	b			** (P<0.01)
80%	10.333	1.155	a	b			** (P<0.01)
60%	9	1		b			** (P<0.01)
40%	6.667	0.577		b	c		** (P<0.01)
20%	4.333	3.687			c		** (P<0.01)
0%	0	0				d	** (P<0.01)

** : Effet hautement significatif, \bar{X} : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonies, a, b, c, d : Groupes homogènes de comparaison statistique des moyennes deux à deux.

1.2.3. Taux d'inhibition :

Les solutions d'extraits au méthanol de *Thymus vulgaris* préparées à 80 et 100% ont accusé un taux d'inhibition comparable à la pénicilline chez *Streptococcus thermophilus*; 75,61 vs 75,61 vs 100%, respectivement

Les solutions préparées à 20,40 et 60% d'extrait de thym a enregistré de faibles taux d'inhibition de *Streptococcus thermophilus*; 31,70, 48,78 et 65,85%, successivement. (**Tableau 11**).

Tableau 11. Effet des différentes dilutions d'extrait de *Thymus vulgaris* sur les variances des taux d'inhibition chez le *Streptococcus thermophilus*.

Solutions d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> .	Taux d'inhibition. (%)	Ecart type	Groupes homogènes				Analyse de variance
Pénicilline.	100	0	a				** (P<0.01)
100%	75,61	4.225	a	b			** (P<0.01)
80%	75,61	8.449	a	b			** (P<0.01)
60%	65,854	7.317		b			** (P<0.01)
40%	48,78	4.225		b	c		** (P<0.01)
20%	31,707	27.702			c		** (P<0.01)
0%	0	0				d	** (P<0.01)


** : Effet hautement significatif, \bar{X} : moyenne, n : nombre de répétition, p : seuil de probabilité, UFC : Unité Forment Colonies; a, b, c, d : Groupes homogènes de comparaison statistique des moyennes deux à deux.

1.2.4. Concentration Minimale Inhibitrice : CMI.

L'extrait de *Thymus vulgaris* préparé à 60% laisse un taux de survi de *Streptococcus thermophilus* d'environ 33,204% ; alors qu'à des taux d'extrait de *Thymus vulgaris* supérieurs, ce microorganisme s'avère incapable de survivre après 24 d'incubation à 37°

C'est à partir d'extrait préparé à 80% que la croissance de *Streptococcus thermophilus* s'annule de manière absolue ; cette concentration est retenue comme étant la concentration minimale inhibitrice (CMI). (**Tableau 12**).

Tableau 12. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

ST	Témoin 0%	20%	40%	60%	80%	100%
Di	0,041	2,019	2,051	2,098	2,349	2,264
Df	0,3	2,172	2,198	2,184	2,211	2,232
df-di	0,259	0,153	0,147	0,086	-0,138	-0,032
Df-Di	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259
S (%)	100	59,07336	56,75676	33,20463	0	0
CMI	 CMI= 80%					

df-di : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures ; Df-Di : différence de densité optique sans extraits de *Thymus vulgaris* et après incubation à 37°C durant 18 heures S : Taux de survie du microorganisme en %.

1.2.5. Concentration Minimale Bactéricide : CMB.

L'extrait préparé à 60% n'a pas inhibé totalement la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Cependant, l'extrait à 80% enregistre un pourcentage de survie proche de 0.01 de l'espèce microbienne expérimentale *Streptococcus thermophilus* ; cette solution à base d'extrait de *Thymus vulgaris* constitue. Donc la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'espèce étudiée. (Figure 4).

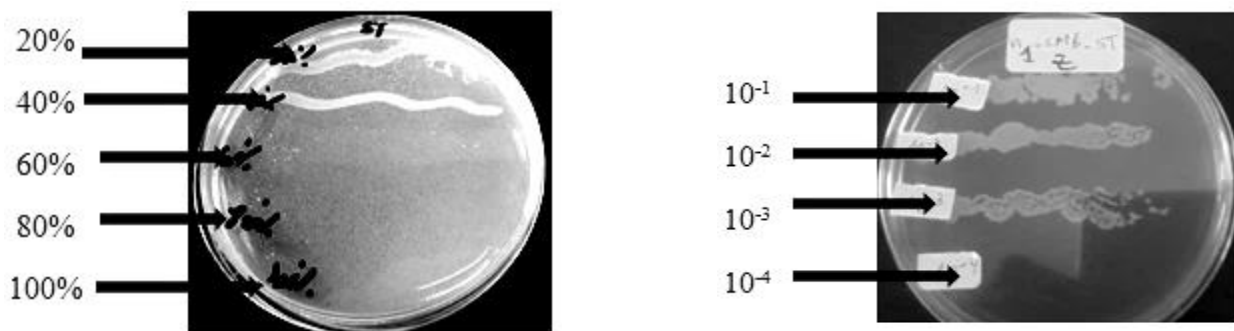


Figure 4. Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait *Thymus vulgaris* sur le *Streptococcus thermophilus*.

Il résulte enfin, à partir des rapports CMB/CMI obtenus (1.333 et 1) pour le *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* respectivement, que l'extrait de *thymus vulgaris* exerce un effet inhibiteur de type bactéricide sur les deux souches étudiées. (**Tableau 13**).

Tableau 13. Action inhibitrice d'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance des bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*).

Désignateur	CMI	CMB	(CMB/CMI)	Effet d'inhibition
E-LB	60%	80%	1,333	Bactéricide.
E-ST	80%	80%	1	
Normes	<ul style="list-style-type: none"> ✚ D'après (Olivier., 2007): CMB/CMI ≤ 2 (Effet bactéricide). CMB/CMI ≥ 2 (Effet bacteristatique). ✚ D'après (Marmonier., 1990): CMB/CMI ≤ 4 (Effet bactéricide). CMB/CMI ≥ 4 (Effet bacteristatique). 			

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 avec l'augmentation de 0 à 80% des concentrations d'extrait de *Thymus vulgaris*.

Par comparaison au témoin la croissance de germes *Lactobacillus bulgaricus* commence à apparaître à 20% et 40% d'extrait méthanolique de Thym (93.10^4 ; 89.10^4) ; mais devient faible surtout à 60% d'extrait (59.10^4). Par ailleurs, un développement nul de ces germes à été enregistré avec les extraits préparés à 80 et 100 %.

La croissance des *Streptococcus thermophilus* est remarquée à 20% et 40% d'extrait de Thym (111.10^4 ; 92.10^4) respectivement; mais elle est fortement réduite surtout à 60% d'extrait (53.10^4). Par ailleurs, aucun développement de ces germes n'est observé avec les extraits préparés à 80 et 100 %. Ceci est dû certainement à l'effet inhibiteur qu'exerce l'extrait de *Thymus vulgaris* sur les *Lactobacillus bulgaricus* et les *Streptococcus thermophilus*.

L'activité améliorée de l'extrait méthanolique du thym peut être expliquée par la présence du thymol, un phénol alkylique qui cause la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille et al., 2003).

De même, 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 similaires entre l'antibiotique (pénicilline) et l'extrait au méthanol du Thym préparé à 100% ; 14 vs 10 mm, en moyenne pour les *Lactobacillus bulgaricus* et 13.667 vs 10.333 mm, en moyenne chez les *Streptococcus thermophilus*.

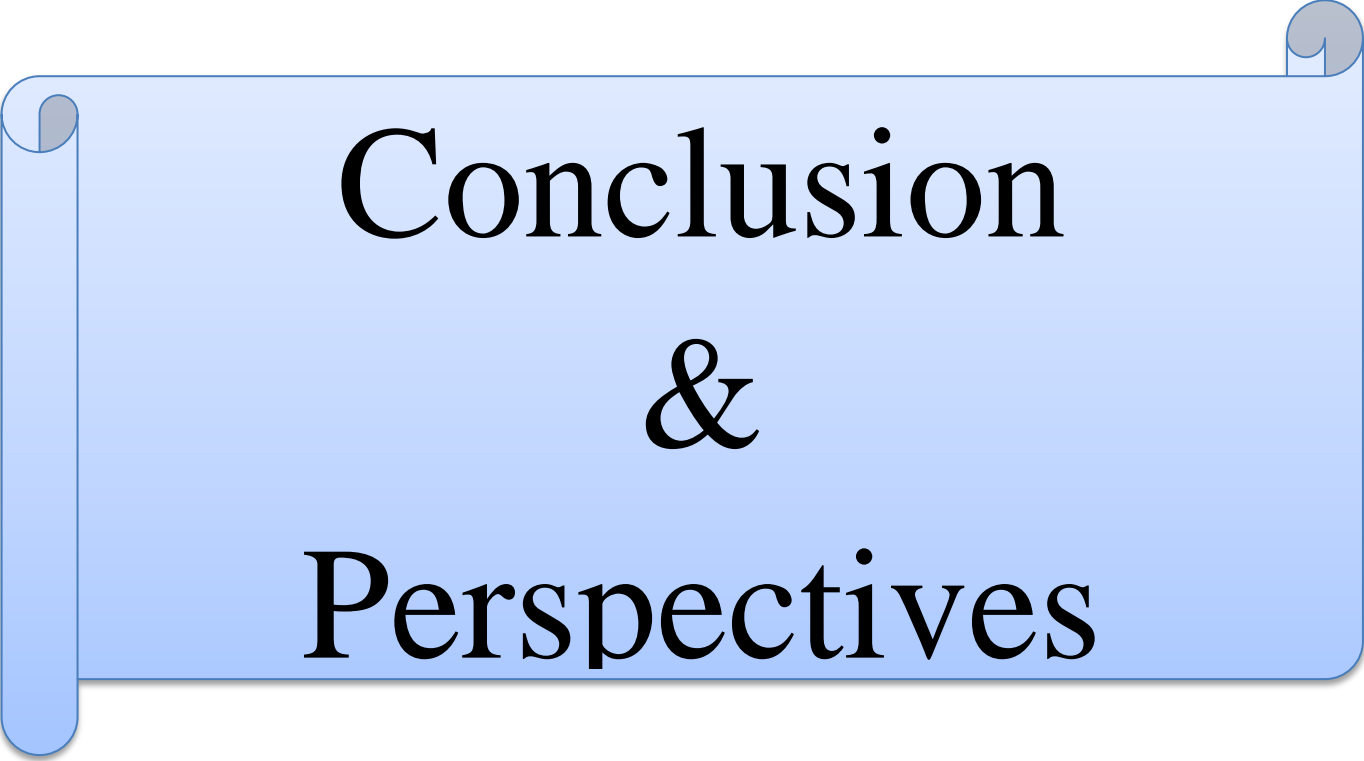
Par ailleurs, Les extraits préparés à 40, 60, 80 et 100% ont marqué des taux d'inhibition de *Lactobacillus bulgaricus* très élevés variant de 54,762 à 71,429 %; alors que celui préparé à 20% enregistre une valeur très faible de 35,714%.

Concernant les *Streptococcus thermophilus* il a été observé que les extraits préparés de 40 à 100% ont enregistré des taux d'inhibition élevés variant de 48,78 à 75,61 % ; alors que celui préparé à 20% a marqué une valeur de 31,70%.

Ceci confirme bien que l'extrait de *Thymus vulgaris* exerce 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* ; d'après (Olivier, 2007) étant donné que ces rapports sont inférieurs ou égale à 2, l'extrait au méthanol de *Thymus vulgaris* récolté dans la région de Mechria a Naama - Algérie- exerce donc un effet de type bactéricide vis-à-vis de ces germes. (Marmonier., 1990); rapporte en d'autre part que lorsque le rapport (CMB/CMI) d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égale 4 ceci suppose 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 de *Thymus vulgaris* exerce un effet bactéricide très intéressant vis-à-vis les bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*). Son incorporation dans le yaourt devra ce faire à des concentrations de moins de 20%.



Conclusion
&
Perspectives

Finalement, nous avons déduis que l'extrait de *Thymus vulgaris* a une activité spécifiquement bactéricide sur les souches lactiques du yaourt. Les nombreuses propriétés naturelles d'extrait de *Thymus vulgaris* en font à la fois des ingrédients nutraceutiques et des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire.

D'une manière générale, les extraits de la plante aromatique (*Thymus vulgaris*) possèdent une activité spécifique variable selon les microorganismes et les conditions environnementales, aussi la généralisation de leur action antimicrobienne n'est pas facilement applicable à tous les aliments. Mais, le recours à ses composants bioactifs s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques.

Aussi, leur utilisation en très faibles quantités est envisageable en raison de leur grande efficacité. Leur utilisation combinée à d'autres procédés de conservation en fera certainement dans les prochaines années l'agent antimicrobien naturel incontournable pour améliorer la durée de vie. Par exemple, dans le cadre de notre étude on peut incorporer cette technique dans la filière laitière pour améliorer la qualité grâce aux effets bactéricides.

L'ensemble de nos résultats obtenus sur la mise en évidence de l'activité antibactérienne d'extrait de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des deux souches lactiques testées (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement active. Cependant, pour la suite de ce travail, des essais complémentaires seront nécessaires et apporteront plus de confirmation à nos résultats et devient surtout se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique de la plante puisqu'elle est étroitement liée à des facteurs écologiques (espèce et sous espèce, l'âge de la plante, la période et lieu de récolte,...) afin d'estimer l'activité biologique intéressante des plantes aromatiques sur le plan qualitatif et quantitatif. Les principes actifs de la plante peuvent être aussi envisagés dans plusieurs domaines tels en yaourtrie.

- Amiot J. (2005) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier*.
- Amiot J. (2005) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier*.
- Axelsson Lars, 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66
 classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 1-10.
- Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le Bourgeois P., Renault P., De Roissart H., Rouvier C., 1994. Méthodes d'identification des bactéries lactiques In Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loric a.pp: 141-160.
- Desmazeaud Michel, 1993. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand.
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J. (2008) Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79: 199-203.
- Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food chemistry*. 63 (3) : 373-383.
http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.Pdf
- Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 691-700.
- Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226. Jassim S.A., Naji M.A. (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl. Microbiol.* 95 (3) : 412-27.
- Kandler O., Weiss N., 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 11-12.
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M. (2004) Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*. 65: 3279-3287.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International. *Journal of Food Microbiology* ., 41: 103-125.

- Lall N., Meyer J.M. (1999) *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J. of Ethno pharmacology*. 66 347-354.
- Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B., 2008. Bergey's taxonomic outlines - Revised *Microbiol.*, 10: 1-19
- Morales, R. (2002) the history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
nov. Syst. Appl. Microbial., 6: 183-195
- Özcan M., J.-C. Chalchat (2004) Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (4) : 68-73.
- Pariente L. (2001) Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. *Académie nationale de pharmacie. Paris* -16-43 p.
- Poletti A. (1988) Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. *Delachaux & Nistlé S. A. Suisse*. Pp : 103 et 131. Quezel P. et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales *Ed C.N.R.S. Tome I*. 565 p.
 pp: 515-530
 recherches laitières, INRA Jouy-en-Josas. France.
 Road Map to the Phylum Firmicutes., vol. 3. Disponible
- Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L., Benno Y., 2004. Human studies on probiotics:
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D., Fischer W., 1985.
- Schleifer K.H. et KilpperBälz R., 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the Systematic Bacteriology. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins (Eds), Baltimore, 2: 1208-1234
- Teuber Michael, Geis Arnold, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228
- Thuille N., Fille M., Nagl M. (2003) Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*. 206: 217-221.
 Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. What is scientifically proven today? In *Lactic Acid bacteria : Microbiological and functional Aspects*. Eds salimen S., von Wright A., Ouwerrhand A., *New york Dekker M.*

1. Les milieux de culture :

➤ Gélose MRS:

La gélose MRS est utilisée pour la culture des *Lactobacillus*. La sélectivité du milieu est uniquement assurée par son pH. Le milieu acidifié à pH 5,4 permet de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts et à pH 5,7, le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Il est conseillé d'employer un milieu plus sélectif pour des prélèvements fortement contaminés.

FORMULE : Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

Composants:	Concentration:
Mélange de peptones	18,0 g/litre
Extrait de levure	4,0 g/litre
Glucose	20,0 g/litre
Tween 80	1,0 ml/litre
Hydrogénophosphate dipotassique	2,0 g/litre
Citrate de tri-ammonium	2,0 g/litre
Acétate de sodium anhydre	3,0 g/litre
Sulfate de magnésium 7H ₂ O	0,2 g/litre
Sulfate de manganèse anhydre	0,034 g/litre
Agar	12,0 g/litre
pH final: 6,2 ± 0,2	

➤ Gélose M17:

Le bouillon M17 a été mis au point pour la culture et dénombrement des streptocoques dans le lait et les produits laitiers. Il favorise la culture des mutants incapables de fermenter le lactose. Il est bien adapté à la culture de *Streptococcus thermophilus* qui est un microorganisme particulièrement exigeant.

FORMULE : Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée :

- Tryptone.....2,50 g
- Peptone pepsique de viande2,50 g
- Peptone papainique de soja5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....2,50 g
- Extrait de viande5,00 g
- Lactose5,00 g

- Glycérophosphate de sodium 19,00 g
- Sulfate de magnésium 0,25 g
- Acide ascorbique 0,50 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,1 \pm 0,2$.

➤ **Mueller Hinton (MH):**

- Milieu relativement riche, mais qui reste **un milieu de base** qui permet la culture des bactéries **non exigeantes**.
- La gélose Mueller-Hinton permet la réalisation de **l'antibiogramme standard (principale utilisation)**.

FORMULE : Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée :

- Infusion de viande 2,0g.
 - Hydrolysat acide de caséine 17,5g.
 - Amidon soluble 1,5g.
 - Agar agar 17,0g.
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $7,3 \pm 0,2$.

Préparation de l'eau physiologie :

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 8.5 pour 1 000 (c'est-à-dire une solution à 0,85 % de masse/volume de NaCl, soit $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).



2. Les différentes étapes d'extraction :

60g de matière végétale est mélangé avec 100 ml de solvant aqueux selon le rapport suivant :

(80/20, solvant / eau, v / v).

- 480 ml Méthanol.

- 120 ml d'eau distillé.



Figure. Procédure d'agitation (durant 6 heures à température ambiante).



Figure. La filtration en utilisant un papier filtre Whatman (0,2 μ m).



Figure. L'évaporation sous vide à 45 °C au l'évaporateur rotatif.



Figure. Différentes dilutions d'extrait (0, 20, 40, 60, 80, 100)%.

3. Préparation des souches lactiques :

Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée conservée au froid à 4 °C on met dans 10 ml de bouillon nutritif. puis incubée à 37°C durant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution constituant la solution mère sera pris pour être ensemencée en surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu spécifique gélifié de croissance pour chaque espèce microbienne (MRS ou M17) puis le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures.



*Lactobacillus
bulgaricus*

*Streptococcus
thermophilus.*

Figure. Activation des souches lactiques.



Lactobacillus bulgaricus



Streptococcus thermophilus.

Figure. Les dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} effectué à partir des inocula de chaque souche.

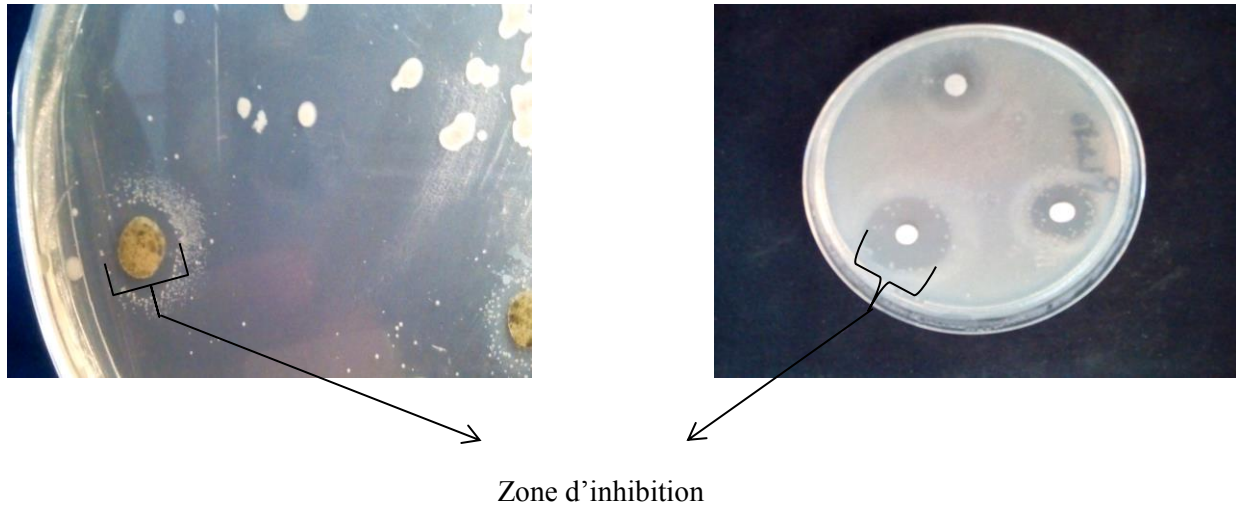


Figure. Exemple de méthode des disques qui montre l'apparaissant des zones d'inhibition en comparaison l'un des concentrations d'extrait avec le témoin (pénicilline).

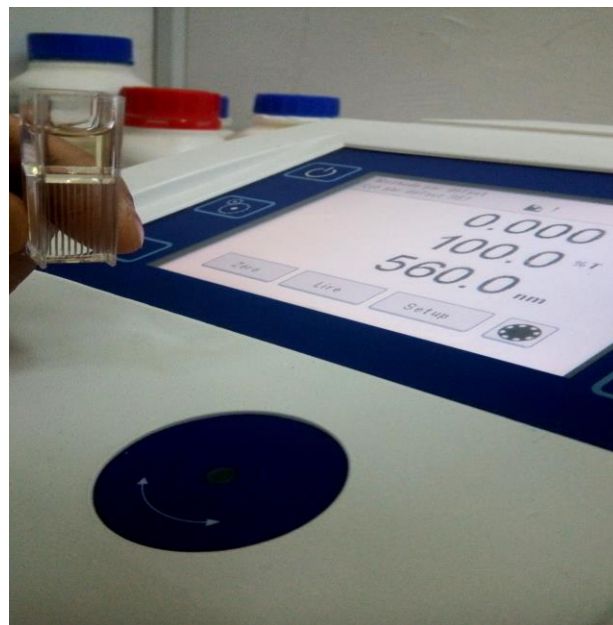


Figure. Utilisation de spectrophotomètre pour mesuré les densités optique afin de déterminé le (CMI).