



DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

Bentata Fatiha & Bekkaye Zakarya

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences agronomiques

Spécialité: Contrôle de la qualité des aliments

Thème :

*Effet antimicrobien des extraits hydro-éthanolique de
Thymus vulgaris (thym) récolté dans la région de Sétif sur
les germes spécifiques du yaourt : Streptococcus
thermophilus et Lactobacillus bulgaricus*

Soutenues publiquement le: 22/06/2017

Devant le Jury :

Président : SELSELET ATTOU G.	PR.	Université de Mostaganem
Encadreur : AIT SAADA D.	MCA.	Université de Mostaganem
Examineur : BEKADA A .	PR.	Université de Tissemsilt
Invité : HAROUNE	Doctorant.	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2016/2017

Thème réalisé au l'laboratoire de la faculté SNV-Université de Mostaganem

Dédicace

*Avant tout c'est grâce à notre Dieu que je suis arrivée
à ce stade .*

*Je dédie ce modeste travail avec toute la profondeur de mes
sentiment :*

*A l'être le plus cher dans le monde , ma douce et ma tendre mère pour
ses souffrances endurées , et sa jeunesse sacrifiée pour me permettre
d'être parmi les meilleurs.*

*A mon très chère père qui m'a donné la confiance et le courage pour
arriver à ce stade .*

A mes frères que j'adore

A mes sœur que j'adore

A toute ma famille sans exception.

*A tous mes collègues de la promotion de contrôle de qualité des aliment
2017 – 2018.*

Bentata fatiha



Dédicace



*Avant tout c'est grâce à notre Dieu que je suis arrivée
à ce stade .*

*Je dédie ce modeste travail avec toute la profondeur de mes
sentiment :*

*A l'être le plus cher dans le monde , ma douce et ma tendre mère pour
ses souffrances endurées , et sa jeunesse sacrifiée pour me permettre
d'être parmi les meilleurs.*

*A mon très chère père qui m'a donné la confiance et le courage pour
arriver à ce stade .*

A mon frères que j'adore : Rafik

A ma sœur que j'adore : Feriel (fifi)

A toute ma famille sans exception.

*A tous mes collègues de la promotion de contrôle de qualité des aliment
2017 – 2018.*

Bekkaye Zakarya

Remerciement

Nous formulons notre profonde gratitude à « ALLAH » le tout puissant qui nous a donnée de la volonté et du courage pour la concrétisation de ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer mes profondes reconnaissances et témoigner notre gratitude pour remercier tous ceux qui nous aide à réaliser ce travail.

chose qui n'est jamais inoubliable ou nous devons la volonté qu'avait déployé

MR : Ait Saadâ Djamel notre encadreur qui nous à progressé d'énormes efforts pour ses conseilles de suivre une bonne itinéraire , et c'est grâce à ses orientation qu'on avait pu redoubler de vigilance pour arriver à ce stade.

Mes sincères remerciements iront également à Monsieur Selselet-Attou ,

Le président de ce mémoire.

Nous remerciant s'adressent aussi au membre de jury Mf Bekkada.A ;

Et Mf Harroun pour avoir accepter

de juger ce travail.

Nous remercions également

Monsieur Abekhti abdelkader , enseignant a université Ahmed Draia Adrar pour leur conseil .

Comme remercions vivement et sincèrement M^{me} Hafida , technicienne du laboratoire

Microbiologique de l'université de Mostaganem.

Enfin Ma profonde gratitude, mes sentiments les plus amicaux et mes infinis remerciements vont à tous et toutes mes collègues et ami(e)s des quatre équipes du pour l'ambiance amicale et conviviale qu'ils ont su tisser au sein du laboratoire.

RESUME

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'effet inhibiteur des composés bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance des deux souches spécifiques du yaourt à savoir : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Les principaux composés bioactifs de Thym ont été extraits par macération d'une prise d'échantillon des matières végétales broyées dans une solution aqueuse de méthanol.

Après évaporation sous vide du méthanol l'extrait aqueux est concentré à 0, 20,40, 60,80 et 100%.

Les mesures et les contrôles suivants ont été testés sur les deux germes *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Taux de croissance, taux d'inhibition, diamètre d'inhibition, CMI et CMB).

L'étude à montre que l'accroissement des concentrations en extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* a engendré une forte activité bactérienne contre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* ; avec des diamètres d'inhibitions qui varient de 04 à 09,667 mm et de 04, 33 à 10,33 mm ; des taux d'inhibition qui oscillent de 30,00 à 72,50% et une croissance microbienne qui varise de $140. 10^5$ à 0 UFC/ml et de $136. 10^5$ à 0 UFC/ml respectivement.

La concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide sont obtenues avec l'extrait de Thym préparé a 60% pour *Streptococcus thermophilus* ; par contre la concentration minimale inhibitrice pour *Lactobacillus bulgaricus* est obtenue avec l'extrait préparé a 80% et la concentration minimale bactéricide observée à 60% .Ainsi, d'après le rapport CMB/CMI égale à 01 et 1,25 respectivement, les extraits préparés s'avèrent exercer une action de type bactéricide sur les deux espèces de bactéries étudiées .

Mots clés : Extraits bioactifs, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, CMI, CMB, Taux de croissance, Taux d'inhibition, Diamètre d'inhibition.

TABLE DES MATIÈRES

Dédicaces	
I- Remerciements	
II- Résumé	
III- Liste des abréviations	
IV- Liste des figures	
VI - Liste des tableaux	
Introduction générale.....	01

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les Bactéries Lactiques

1-Historique.	04
2-Définition.....	04
3-Habitat.....	05
4- Caractéristique générales.....	06
5-Classification	06
6-Les coques lactiques.....	08
7-Voies fermentaires des bacteries lactiques	09
7.1. Définition.....	09
7.2.Voie fermentaires générales des métabolismes carbonés.....	09
7.2.1. Voie homofermentaires	10
7.2.2. Voie hétérofermentaires	10
8-Rôles et intérêts des bactéries lactiques	11
8-1 domaine alimentaire.....	11
8.1.1 Rôle sur la structure et la texture.....	11
8-1-2 : rôle dans la conservation.....	12
8-1-3 : rôle sur les caractéristiques organoleptiques.....	12
8.2-Domaine de santé	12
8.3- Les bactéries lactiques comme pro biotiques.....	12
9- Les caractères bios industriels des bactéries lactiques.....	13
10-Exemple de produit fermenter.....	13

10.1. Les Yaourts (Yoghourts).....	13
10.2.Les germes spécifiques de yaoughts	14
10.2.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	14
10.2.1.1. Taxonomie.....	14
10.2.1.2. Utilisation industrielle de <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
10.2.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	17
10.2.2.1. Définition.....	17
10.2.1.1. Taxonomie.....	17
11-Interaction de <i>Streptococcus thermophilus</i> avec <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	17

Chapitre2 : *Thymus vulgaris*

1-Historique	21
2-Description botanique	21
3-Origine de nom	23
4- Distribution géographique.....	23
5-Noms communs	24
6-Classification	24
6.1. Classification classique	24
6.2. Classification phylogénitique	24
7-Propriétés de thym	25
8-Principes actifs du thym.....	25
9-Composition chimique d'huiles essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	25
10-Usage médicinaux	26
11-Usage culinaires.....	28

12-Autre usages de Thym.....	28
13-Culture de <i>Thymus vulgaris</i>	29
13-Période de récolte	30
14-Conclusion bibliographique	31

Deuxième partie : Méthodologie

1-Objectif.....	32
2-Région de prélèvement et traitements préliminaires du matière végétal	32
3-Extraction des composés bioactifs	33
4-Etude des effets antimicrobiens des extraits de Thym.....	35
4.1. Activation des inocula microbiens	35
4.2. Méthode de contact direct.....	36
4.3. Méthode des disques par diffusion sur gélose.....	38
4.4. Détermination de la concentration minimal inhibitrice	40
4.5.Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	41

Troisième partie : Résultats et Discussion

1-Résultats.....	43
1.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	43
1.1.1.Diamètre d'inhibition	43
1.1.2. Taux d'inhibition.....	45
1.1.3.Méthode de contact direct.....	46
1.1.4. Concentration minimale inhibitrice.....	47

1.1.5. Concentration minimale bactéricide.....	48
1.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	50
1.2.1. Diamètre d'inhibition	51
1.2.2. Taux d'inhibition.....	52
1.2.3. Méthode de contact direct.....	53
1.2.4. Concentration minimale inhibitrice.....	53
1.2.5. Concentration minimale bactéricide.....	55
2-Discussion.....	58
❖ Conclusion	62
❖ Référence bibliographique	
❖ Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01. Quelques caractéristiques des bactéries lactiques.....	07
Tableau 02. Quelques genres de bactéries lactiques.....	08
Tableau 0 3. La nouvelle classification des lactobacilles.....	19
Tableau 04. Composition chimique d'huiles essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> analysée par CPG-SM.....	26
Tableau 5 .Concentrations des extraits de <i>thymus vulgaris</i> obtenus par macération	35
Tableau 6. Etape d'immersion des disques dans les solutions d extraits de <i>thymus vulgaris</i> et la pénicilline.....	39
Tableau 7. Effet des différentes dilutions des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variations des diamètres d'inhibition chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	44
Tableau 8. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la variations des taux d'inhibitions chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	45
Tableaux 9. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	47
Tableau 10. Evaluation de la concentration minimale bactéricide des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	48
Tableau 11. Action inhibitrice des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	50
Tableau 12. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la variations des taux d'inhibitions chez <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	52
Tableaux 13. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	53
Tableau 13. Evaluation de la concentration minimale bactéricide des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	54
Tableau 14. Action inhibitrice des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	57

LISTE DES FIGURES

Figure 01. <i>Lactobacilles</i> Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000). 1b. <i>Leuconostoc lactis</i> observé au M.E.T. (x 10000).....	03
Figure 02. Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses.chez les bactéries lactiques.....	10
Figure 03. Micrographes montre les différent morphologies cellulaire de lactobacillus	17
Figure 04 . Aspect botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	22
Figure 05. Physiologie de <i>Thymus vulgaris</i>	22
Figure 06. Zone de prélèvement du matériel végétal (données cartographique, Google Maps, 2017).....	32
Figure07. Matière végétale broyée de <i>Thymus vulgaris</i>	32
Figure 08. L'extraction par macération.....	33
Figure 09. Méthode de filtration des extraits hydro alcooliques de <i>Thymus vulgaris</i>	34
Figure10 . Méthodes d'extractions des composé bioactif.....	34
Figure 11 . Activation des deux espèces <i>Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus</i>	34
Figure 12. Méthodes de contacte direct.....	37
Figure13 . Disque préparés à partir de papier filtre Wattman.....	38
Figure 14. Méthodes des disques.....	39
Figure 15 . Méthode de la détermintion de la CMI des extraits expérimentaux sur la croissance des souches étudiées.....	40
Figure 16 . Méthode de la détermination de la CMB (Concentration minimales bactéricides) des espèces étudiées.....	42

Figure 17 .Effet des extraits bioactifs à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> préparés à (20,40, 60, 80,100)% et de la pénicilline sur le diamètre d'inhibition de la souche <i>Streptococcus thermophilus</i>	43
Figure 18 .Effet des extraits bioactifs de Thym sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	45
Figure 19 . Evaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	49
Figure 20 . Déterminations de la CMB de l'extrait bioactifs de Thym sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	50
Figure 21 .Diamètres d'inhibition des extraits bioactifs préparés à (20,40, 60, 80,100)% et de la pénicilline sur la souche <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	51
Figure 22 .Effet des extraits bioactifs de Thym sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	54
Figure 23 . Evaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	56
Figure 24 . Déterminations de la CMB de l'extrait éthanoliques bioactifs de Thym sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	56
Figure 25 . Milieu M.R.S.....	63
Figure 26 .Milieu M17.....	64
Figure 27 . Agar Mueller Hinton.....	65
Figure 28 . Bouillon de Mueller Hinton.....	66
Figure 29 .Penicillin G.....	68
Figure 30 . Bouillon nutritif.....	68
Figure 31 . L'eau physiologique.....	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ❖ **ARN** : Acide RiboNucléique .
- ❖ **ARNt**: ARN de transfert.
- ❖ **ATP**: Adénosine Triphosphate.
- ❖ **BL**: bactérie lactique.
- ❖ **CO₂**: dioxyde de carbone.
- ❖ **dATP**: Désoxyadénosine Triphosphate.
- ❖ **dCTP**: Désoxycytidine Triphosphate .
- ❖ **DHAP**: dihydroxyacétone-phosphate .
- ❖ **dTTP**: Désoxythymidine Triphosphate .
- ❖ **FAO/OMS**: Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé.
- ❖ **FBP**: fructose-1, 6- bisphosphate .
- ❖ **FBA**: fructose-1, 6- bisphosphate aldolase .
- ❖ *Lb. Lactobacillus*.
- ❖ *Lc. Lactococcus*.
- ❖ *Ln. Leuconostoc* .
- ❖ **M.E.T.**: microscope électronique à transmission.
- ❖ **NAD⁺/ NADH, H⁺** Coenzyme d'oxydoréduction nicotinamide adénine dinucléotide .
- ❖ **Pi**: phosphate inorganique.
- ❖ *Sc. Streptococcus* .
- ❖ **UFC**: unité formant colonie.

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce végétale *Thymus vulgaris* des labiées très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen.

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture ; mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu.

Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de treize genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissala*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* (Carine et al, 2009).

Malgré la disponibilité de plusieurs techniques de conservation fiables et adéquates (ex. réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc.), la contamination et la

détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention d'aliments sécurisés mais présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum.

Dans ce cadre, ce travail de master a consisté à poursuivre les recherches déjà initiées au sein de l'équipe de recherche affiliée au laboratoire de Technologie alimentaire et Nutrition de l'université de Mostaganem et pour sur l'étude des L'effets antimicrobien des extraits au éthanol aqueux de *Thymus vulgaris* (thym) récolté dans les régions de Sétif sur les germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobaccillus bulgaricus*.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de la plante en composés bioactifs et à déterminer leur propriété biologique. Pour cela l'étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extrait et la quantification des principaux actifs de l'extrait.

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antibactérienne (bactéricide ou bactériostatique) qu'exercent leur efficacité des extraites de *Thymus vulgaris* contre la prolifération des deux souches spécifique du yaought ; l'efficacité des contre *Sterptococcus thermophilus* et *Lactobaccilus bulgaricus* .

La présentation des résultats de ce travail sera précédée d'une synthèse bibliographique reprenant les connaissances actuelles sur les bactéries lactiques et le *Thymus vulgaris*.

La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser ce travail. Les résultats obtenus au cours de ce travail sont alors exposés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail et ouvrira les perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

Les plantes médicinales donne le *Thymus vulgaris* fréquemment perdurant en Algérie restent une source fiable des principes composés bioactifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques.

Ces composés considérés comme des agents antioxydants de premiers ordre peuvent être employées à la prévention de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires.

Notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des spécificités thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées en médecine.

Il est important donc d'essayer de exploiter ce patrimoine en vue de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de santé et d'être une alternatif aux médicaments synthétiques ;
- Développer des médicaments intradicalaires à base des plantes, doués d'une activité antioxydante.
- Réaliser des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydant et antibactérienne des composés poly phénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxications alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientés vers la recherche de substances naturelles entre autres les extraits des plantes médicinales des bactéries lactiques.

Quant aux bactéries lactiques ils sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités

et exempts de conservateurs chimiques. Leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010**).

L'intérêt des extraits des plantes médicinales et des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces composés bioactifs ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques (**Dortu et Thonart, 2009**).

1-Historique

Bien avant que l'on soit conscient de leur existence, les bactéries lactiques, ont toujours été utilisées cependant, comme ferment elles ne sont utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (**Ross et al., 2002**). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. **Conn (1889), Storch (1890) et Weigmann (1896)** ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**De Roissart et Luquet, 1994**).

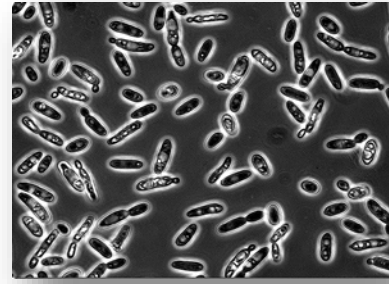
2-Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la 1^{ère} fois par **Orla –Jensen en 1919**, réunit plusieurs genres de différentes morphologies (**Voir figures 1a et 1b**) ayant pour caractère commun leur capacité à fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique (**Novel, 1993**).

Se sont des microorganismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aérotolestants et ne possédant pas de catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (**Raynaud , 2006**).



a/ *Lactobacillus* Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000).



b/ *Leuconostoc lactis* observé à M.E.T. (x 10000)

Figure 1. *Lactobacillus* Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000). 1b. *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000).

3-Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**De Roissart , 1986**).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. Lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé) (**Bergey's manual, 2009**). Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries.

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb.*

curvatus et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (**Demazeaud., 1996**).

4-Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 mol % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries (**Ammour., 2004**)). ce sont des procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, (**voir tableau 1**), et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Holzapfel et al., 2001 ; Gevers., 2002**) .Toutes les bactéries lactiques en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- L'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes).
- L'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives).
- L'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (**Vandamme et al., 1996**).

Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (**De Roissart et Luquet., 1994**).

5- Classification des bactéries lactiques

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**De Roissart et Luquet., 1994; Holzapfel et al., 2001**) .

Tableau1. Quelques caractéristiques des bactéries lactiques.

Caractéristique	Coques Bacilles			
	Bifidobacterium	Lactobacillus	Pediococcus	Streptococcus
Formation des tétrades		±	+	
Production de gaz b		±	-	-
Croissance à 10°C	+c	±	±	
Croissance à 45°C	-	±	±	±
Croissance dans 6.5% NaCL NDd	NDd		±	-
Croissance dans 10% NaCL		±	±	-
Croissance à pH 4,4 ND	ND		-	-

(Axelsson ,2004)

Notes :

+ : Positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

b : Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

c : Faible quantité de CO₂ produite selon le milieu.

d : Peuvent ne pas se développer dans 8% NaCL.

Les bactéries lactiques sont définies comme des bactéries qui fermentent le glucose pour produire surtout l'acide lactique. Cependant cette définition couvre plus de taxa que ceux désignés par bactéries lactiques. C'est surtout leur importance dans la fermentation des aliments et produits alimentaires (viandes, végétaux, fruits, poissons, produits laitiers et ensilage) qui les délimite (Vandamme et al., 1996).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différent ; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus, Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus (Carine et al., 2009).

Les principaux genres des bactéries lactiques décrits dans les paragraphes suivants sont classés dans le même phylum, classe et ordre :

- Phylum BXIII : *Firmicutes*.
- Classe I : *Bacilli*.
- Ordre II : *Lactobacillales*.

Seuls varient les familles et les genres qui seront précisés dans chaque partie. Le **tableau 2** représente les différents genres de bactérie lactique.

Tableau 2. Quelques genres de bactéries lactiques.

Genres	cellules		fermentation	ADN G+C(%)	Références
	forme	Arrangements			
Streptococcus	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46	Schleifer, 1986
Leuconostoc	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43	Farrow et al, 1989
Pediococcus	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42	Schleifer, 1986
Lactobacillus	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53	Kandler et Weiss 1986

(Bekhouche , 2006)

6-Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des Streptococcaceae. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique).

Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les

genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Stiles et Holzappel., 1997).

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* : Ils étaient anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Parmi le genre *Streptococcus*, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *Sc. thermophilus*. . Les *Enterococcus* composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*).

Selon Guiraud (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lactococcus Lactis subsp. Cremoris*, *Lc. Lactis subsp. Lactis* et *Lc. Lactis subsp diacetylactis*. (Bekhouche., 2006).

7- Les voies fermentaires des bactéries lactiques

7-1 Définition

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott *et al.*, 2003) .

7- 2 Voies fermentaires générales des métabolismes carbonés

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**Figure 4**). Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff- Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou

deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (**Cocaign-Bousquet et al, 1996**).

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP).

7-2-2- Voie hétérofermentaires

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains lactobacilles.

8 - Rôle et intérêt des bactéries lactiques

8-1- Domaine alimentaire

8-1-1- Rôle sur la structure et la texture

Se sont les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé + ou - ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée ; l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides (**Satura et Federighi., 1998**).

8-1-2- Rôle dans la conservation

Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques. *production de bactériocine : ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, ils sont généralement thermorésistantes (**Satura et Federighi., 1998**).

8-1-3 : rôle sur les caractéristiques organoleptiques

Par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le di acétyle et l'acétaldéhyde, qui responsable des saveurs caractéristiques. (**Boudjema, 2008**).

8-2 Domaine de santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres pas encore :

- *Améliore la digestion de lactose.
- *Le traitement de certaines infections ou diarrhées.
- *Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.
- *Utilisation dans l'élaboration des vaccins (**Calvez et al., 2009**).

8-3 Les bactéries lactiques comme pro biotiques

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriées ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO., 2001) ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt (**Makhloufi., 2012**).

9- Les caractères bios industriels des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont la base de la fabrication des différents produits alimentaires tels que les produits laitiers (yaourt, fromage, ...), les produits carnés, et les produits végétaux, aussi elles procurent une meilleure conservation pour ces denrées alimentaire. Ainsi elles sont dotées de plusieurs pouvoirs (**Satura et Federighi., 1998**).

10-Exemple de produit fermenter

10-1-Les Yaourts (Yoghourts)

Selon la définition donnée en 1977 par l'OMS, le Yourt ou yaghourt est le produit de la coagulation par « fermentation lactique acide due à *Lactobacillus bulgaricus* et à *Streptococcus thermophilus* d'un lait ou lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec...) avec ou sans additif. Les microorganismes du produit final doivent être viables et abondants » (**Leyral et Vierling ., 2007**).

La flore des yaourts naturels tels qu'elle a été étudiée en Bulgarie et en Yougoslavie est beaucoup plus variée. On y a isolé et identifié une certaine de souches microbiennes différentes. Certaines d'entre elles sont indésirables car elles modifient l'aspect ou le goût du yaourt. En fait, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont les seules espèces indispensables. Elles acidifient le lait par fermentation homolactique du lactose. L'acide lactique est donc le produit principal de la transformation. Des quantités plus faibles d'autres substances sont présentes : éthanol, éthanal, acétone, butanole², et concourent aux qualités organoleptiques du produit (**Leyral et Vierling ., 2007**).

Lactobacillus bulgaricus possède, en outre, une activité protéolytique et lipolytique modérée et transforme partiellement la caséine et les graisses du lait. Les produits d'hydrolyse de la caséine donnent au yaourt un goût de peptone (**Leyral et Vierling ., 2007**).

Lactobacillus bulgaricus et *Streptococcus thermophilus* sont des espèces symbiotiques : les acides aminés produits par l'hydrolyse de la caséine stimulent la

croissance du *Streptocoque*. Tandis que l'acidification engendrée par son développement place *Lactobacillus bulgaricus* dans les conditions optimales de croissance (Gay et al., 2007).

Jadis, les yaourts étaient produits en ensemençant du lait du jour avec un yaourt de la veille. L'ensemble était mis à fermenter deux à trois jours dans une panse d'animale à la température du local.

Aujourd'hui, le lait est pasteurisé etensemencé avec les deux ferments spécifiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*). Ces ferments sont les descendants lointains de ceux du premier yaourt transmis par de multiples réensemencements. L'ensemble est chauffé à 45 C° pendant quelques heures. A la fin de la fermentation, commence la chaîne du froid qui ne doit pas être rompue jusqu'à la consommation.

En fait, l'acidité du produit et l'activité antibiotique de deux espèces microbiennes du yaourt suffisent à contrarier le développement de la plupart des microorganismes contaminants. C'est pourquoi le yaourt était Jadis considéré comme une forme de conservation du lait. On ne retrouve que très rarement des microorganismes pathogènes dans un yaourt (Leyral et Vierling., 2007).

10-2 -Les germe Spécifiques de Yaourts

10-2-1- *Streptococcus thermophilus*

10-2-1-1 - Taxonomie

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique thermophile appartenant à la famille des *Streptococcaceae* comportant deux genres phylogénétiquement très proches : *Streptococcus* et *Lactococcus*.

D'un point de vue génomique, 70 souches (génomés complets publiés au **1er juin 2011**), sont référencées au sein de cette famille où l'on peut distinguer des espèces pathogènes de l'homme (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*) ou de l'animal (*Streptococcus suis*, *Streptococcus equi*), d'autres espèces commensales de la bouche et pathogènes opportunistes

(*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* et *Streptococcus gordonii*) et enfin des espèces non pathogènes et largement utilisées dans l'industrie laitière avec notamment *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis*. Les caractères communs que partage cette famille sont une morphologie en coques à Gram positif de **0,5 à 1 µm** de diamètre, présentant un groupement typique en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés. Toutes ces espèces utilisent la voie fermentaire de dégradation des sucres simples et sont par ailleurs dépourvues de catalase.

La classification originelle des espèces de streptocoques est assez complexe car pour des raisons historiques, elle a été effectuée au départ sur la base de différences macroscopiques de pouvoir hémolytique des espèces (système Lancefield) qui ont été rapprochées à des différences immunologiques de polysaccharides de paroi (groupes A, B, C, F et G) ou d'acides lipotéchoïques (groupe D) (**Facklam, 2002**). Cette classification, encore utilisée en microbiologie clinique, présente des inconvénients. En effet, par exemple *S. pyogenes*, auquel on associe souvent l'attribut GAS pour « Groupe A *Streptococcus* » n'est finalement pas le seul streptocoque à posséder l'antigène A puisque *S. anginosus* ou *S. dysgalactiae equisimilis* l'expriment également. De plus, il n'est pas rare qu'une souche donnée puisse porter en même temps plusieurs antigènes (**Facklam, 2002**).

Selon la dernière classification, *S. thermophilus* appartient au groupe *salivarius* qui comprend aussi les espèces *S. salivarius*, *S. vestibularis* et *S. peroris*. *S. thermophilus* est une bactérie homofermentaire stricte, microaérophile et dont la température optimale de croissance est de **42°C** (selon les souches de **37 à 42°C**). Les souches de *S. thermophilus* ont été isolées à partir d'environnements laitiers, mais quelques souches pourraient provenir de plantes (**Michaylova et al., 2007**).

10-2-1-2-Utilisation industrielle de *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est le seul streptocoque présentant un intérêt industriel au sein du genre *Streptococcus*. Il est d'ailleurs également le seul dans son genre reconnu comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Les autres espèces du groupe *salivarius* sont des bactéries commensales de la cavité orale et du tractus gastro-intestinal. Les espèces du sous-groupe *salivarius* étaient considérées comme non pathogènes jusqu'à l'implication récente de *S. vestibularius* et *S. salivarius* dans des cas d'endocardite et de méningite (Doyuk *et al.*, 2002; Idigoras *et al.*, 2001); seul *S. thermophilus* n'a pas été impliqué, jusqu'à présent, dans des maladies infectieuses. Le séquençage complet des génomes de 4 souches de *S. thermophilus* et leur analyse révèlent l'absence ou l'inactivation des gènes liés à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Bolotin *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011).

En plus de son usage traditionnel en culture mixte avec *Lactobacillus bulgaricus* pour la fabrication de yaourt, *S. thermophilus* est utilisé pour produire nombre de fromages tels que l'Emmental, le Parmesan, le Provolone, la Mozzarella et l'Asiago (Parente et Cogan, 2004). On l'utilise aussi depuis peu pour la production de fromages de type Cheddar en combinaison avec d'autres ferments mésophiles (Awad *et al.*, 2005). Au final, *S. thermophilus* joue donc son rôle essentiel de ferment dans l'industrie laitière dans la fabrication de produits laitiers dont la valeur économique est supérieure à 300 milliards de dollars par an (Datamonitor's Dairy: Global Industry Guide, Datamonitor, 2010). Les français consommant à eux seuls plus d'un million et demi de tonnes de yaourts et laits fermentés chaque année (L'économie laitière en chiffres, Cniel, 2010).

L'un des rôles principal joué par *S. thermophilus* en industrie laitière est de garantir une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Cette vitesse d'acidification dépendra bien sûr de la souche utilisée, de sa vitesse de production de lactate mais aussi de son potentiel génétique par rapport au système protéolytique (Courtin *et al.*, 2002) et à l'activité uréasique (Juillard *et al.*, 1988; Monnet *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2004).

10-2 -2- *Lactobacillus bulgaricus*

10-2-2-1- Définition

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries (**Figure 3**).

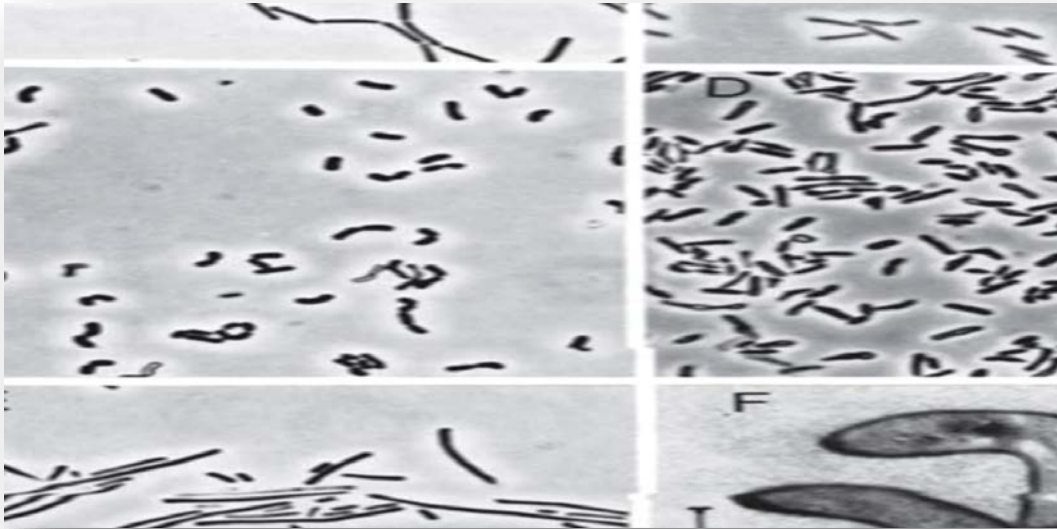


Figure3. Micrographes montre les différent morphologies cellulaire de lactobacillus: D, *Lactobacillus minor* et F, involution de lactobacillus dans une section mince de grain du kéfir. (Bergey's manual., 2009) .

10-2-2-2 -Taxonomie

Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation ,les Lactobacilles homofermentaires stricts regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégrade les hexoses en acide lactique (**Axelsson, 1993**).

Les Lactobacilles homofermentaires stricts regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique

ou en éthanol et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique ; ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate (**Stiles et Holzappel., 1997**).

Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas EMP et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (**Stiles et Holzappel., 1997**).

Selon **Atlan (2000)**, ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par **ORLA-JENSEN (1919)**.

- **Le groupe *delbrueckii*** comprend les espèces : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helvetis*, *Lb. crispatus*, d'autres lactobacilles homofermentaires et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lb. acetotolerans* et *Lb. hamsteri*).
- **Le groupe *casei-Pediococcus*** est le groupe le plus large car il regroupe de très nombreux *Lactobacillus* homofermentaires stricts (*Lb. avarius*, *Lb. salivarius*), hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*) et des hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. parakefir*). Ce groupe contient aussi la plupart des souches de *Pediococcus* (*Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*).
- **Le groupe *Leuconostoc*** comprend les Lactobacilles hétérofermentaires stricts et les espèces du genre *Leuconostoc* (*Ln. amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) ainsi que le genre *Weissella* dans lequel sont regroupés plusieurs Lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. confusus*, *Lb. viridescence*, *Lb. halotolerans*) et *Ln. paramesenteroides*. La classification des lactobacilles selon **Atlan (2000)** est donnée dans le **tableau 3**.

Tableau3 . La nouvelle classification des lactobacilles.

Groupe1 : <i>Delbrueckii</i>	Groupe2 : <i>casei-Pediococcus</i>	Groupe3 : <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. Acidophilus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. crispatus</i> Autres Homofermentaires Hétérofermentaires Facultatifs <i>Lb. Acetotolerans</i> <i>Lb. hamster</i>	Homofermentaires stricts <i>Lb. Avarius</i> <i>Lb. salivarius</i> Hétérofermentaires facultatifs <i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. curvatus</i> Hétérofermentaires stricts. <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. parakefir</i> Genres <i>Pediococcus</i> <i>Pc. damnosus</i> <i>Pc. parvulus</i> <i>Pc. acidilactici</i> <i>Pc. Pantosaceus</i>	Hétérofermentaires stricts Genre <i>Leuconostoc</i> <i>Ln. amelibiosum</i> <i>Ln. carnosum</i> <i>Ln. gelidum</i> Genre <i>Weissella</i> <i>Ln. paramesen</i> <i>Lb. confusus</i> <i>Lb. halotolerans</i> <i>Lb. viridescens</i>

Atlas (2000)

11-Interaction de *Streptococcus thermophilus* avec *Lactobacillus bulgaricus*

Beaucoup de produits alimentaires sont fermentés à partir de cultures mixtes comprenant des bactéries, des levures ou des champignons filamenteux. C'est particulièrement le cas des produits contenant *S. thermophilus* qui n'est jamais utilisé seul mais dans des écosystèmes plus ou moins complexes. Ainsi par exemple la fabrication du yaourt nécessite, de part la législation française, une fermentation effectuée par les deux bactéries lactiques *S. thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Durant la fermentation du lactose, les deux espèces contribuent à l'acidification, à la texture et à la saveur du produit fini en produisant des exopolysaccharides et des composés aromatiques comme l'acétaldéhyde. Bien que les deux espèces soient capables de se développer individuellement dans le lait, il a été démontré que celles-ci

voyaient leur croissance et leur production d'acide stimulées lorsqu'elles étaient associées.

Ce phénomène est appelé proto-coopération et s'explique par la mise en place d'échanges nutritionnels entre les deux espèces. Comme énoncé précédemment, le lait contient peu d'acides aminés libres et toutes les souches de *S. thermophilus* ne possèdent pas la protéase de paroi PrtS. Ainsi, les souches de *S. thermophilus* dégradant difficilement les caséines du lait peuvent profiter directement de l'action de la protéase PrtB de *L. bulgaricus* (Courtin *et al.*, 2002).

A son tour, *S. thermophilus* stimule la croissance de *L. bulgaricus* par la production de certains métabolites comme l'acide formique, le CO₂, l'acide pyruvique et l'acide folique (Crittenden *et al.*, 2003; Derzelle *et al.*, 2005; Driessen *et al.*, 1982).

Plus récemment, deux études postgénomiques ont permis d'affiner la compréhension des interactions liant ces deux espèces (Herve-Jimenez *et al.*, 2008; Herve-Jimenez *et al.*, 2009).

Une stimulation de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés ainsi que la mise en place probable d'une réponse à un stress oxydant chez *S. thermophilus* a été mise en évidence en coculture avec *L. bulgaricus*. L'hypothèse proposée par les auteurs est que *S. thermophilus*, en réponse à la production de peroxyde d'hydrogène par *L. bulgaricus*, adapte son métabolisme de façon à diminuer la concentration de fer intracellulaire et ainsi minimiser les dégâts provoqués par les espèces oxygénées réactives (ROS) générées par la réaction de Fenton. Enfin, la répression de gènes du métabolisme des purines et à l'inverse l'induction d'une perméase type xanthine/uracile chez le streptocoque suggère que les purines ou leurs précurseurs seraient fournis par *L. bulgaricus* et consommés par les streptocoques. Une partie seulement de ces adaptations métaboliques liées à la coculture avec *L. bulgaricus* ont depuis été confirmées avec un autre couple *S. thermophilus/L. bulgaricus* Atlan (2000).

1- Historique

Si l'on ne sait pas précisément ce que nos ancêtres mangeaient au début de l'humanité il y'a 5 à 7 millions d'années, il est certain que les plantes faisaient partie de leur alimentation quotidienne. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y 'a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon **OMS** (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (**Farnsworth et al, 1986**). En effet sur les **300 000** espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique (**Millogo et al, 2005**).

2-Description botanique

Thymus vulgaris, est un sous arbrisseau, vivace, touffu et très aromatique de 7-30 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert grisâtre. Ses tiges ligneuses à la base, herbacées supérieurement sont presque cylindriques, ces tiges ligneuses et très rameuses sont regroupées en touffe ou en buisson très dense. Ses feuilles sont très petites, ovales, à bord roulés en dessous à nervures latérales distinctes, au pétiole extrêmement court et blanchâtres à leur face inférieure. Ses fleurs sont presque roses ou presque blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures. Le limbe du calice est bilabié, un peu bossu. La corolle de taille variable, un peu plus longue que le calice mais la partie tubulaire de la corolle ne dépasse pas celle du calice, les étamines sont incluses. La période de la floraison commence en mai-début de juin (**Wikipédia, 2008**) (**Figure 4**) .



Figure 4 : Aspect botanique de *Thymus vulgaris* (Wikipédia, 2008).

Sous-arbrisseau de 10-30 cm., d'un vert blanchâtre ou grisâtre, très aromatique; tiges ligneuses, dressées ou ascendantes, non radicantes, tortueuses, formant un petit buisson très serré ; rameaux tomenteux-blanchâtres tout autour ; feuilles petites, lancéolées-rhomboidales ou linéaires, obtuses, enroulées par les bords, non ciliées à la base, couvertes en dessous d'un tomenteux dense et court ; fleurs rosées ou blanchâtres, en têtes globuleuses ou en épis à verticilles inférieurs écartés ; calice velu, à tube un peu bossu en avant à la base (**Figure 5**) (**Bonnier,1889**) .

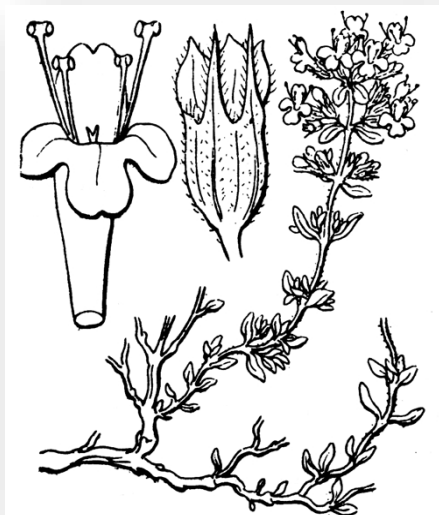


Figure 5.Physiologie de *Thymus vulgaris* (Bonnier ,1889) .

3-Origine du nom

Le nom thym proviendrait bien du latin que du grec :

°Thymus : «parfumer» (latin) .

°Thumus : «courage» (grec) .

4-Distribution géographique

Le thym est une plante originaire de l'ouest des régions méditerranéennes (**Ozcan et Chalchat, 2004**) et aussi autochtone du sud d'Europe (**Takeuchi et al, 2004**). Plus précisément, le thym commun préfère un sol légèrement acide, bien drainé et rocailleux (calcaire), en plein soleil et au sec, mais la plante se développe également sur un sol alcalin filtrant, léger ou compact (d'argile et de limon) ou très poreux (sableux), un peu humide et frais. La capacité de cette plante à résister à de très forte chaleur provient de son huile essentielle qui est produite la nuit et s'évapore la journée ; c'est par cette action que la chaleur sera consommée.

Plus précisément, le thym commun préfère un sol légèrement acide, bien drainé et rocailleux (calcaire), en plein soleil et au sec. Mais la plante se développe également sur un sol alcalin, filtrant, léger ou compact (d'argile et de limon) ou très poreux (sableux) ; un peu humide et frais (**Wikipédia, 2008**).

Sa résistance au gel est assez limitée, jusqu'à - 15 °C, néanmoins sa zone de rusticité est de 5 à 9. Une culture de thym doit donc être protégée l'hiver et ne résiste pas en cette saison à 1 500 mètres dans les Alpes où elle pousse (jusqu'à 2 000 mètres) ; mais elle pourra survivre sous une bonne couverture de neige. Certaines espèces sont plus adaptées aux climats plus rudes que d'autres, comme l'espèce *Thymus polytrichus* (serpolet à pilosité variable) très présente dans les Alpes du Sud dans les zones pâturées très rases et sur sols rocailleux (**Wikipédia, 2008**).

La capacité de cette plante à résister à de très fortes chaleurs provient aussi de son huile essentielle qui, produite la nuit, s'évapore le jour : c'est par cette action que la chaleur sera consommée. Ce principe fut découvert en **1960**. C'est aussi pourquoi le

thym sauvage sera moins résistant une fois transplanté en Europe occidentale (Wikipédia, 2008).

Le thym craint légèrement les acariens et les maladies qui amèneraient ses racines à se dégrader, Par contre son huile essentielle aux vertus désinfectante protège sa partie aérienne (Wikipédia, 2008).

5-Noms communs

Selon (Reynier Alfred ,1904) il y'a différentes appellations de *Thymus vulgaris* on note :

FR : Farigoule, Thym commun, Thym cultivé, Thym vulgaire.

GB : Common Thyme, Culinary Thyme, French Thyme, Garden Thyme .

6-Classification

Cette espèce botanique est classée selon (Negre ,1972) comme suite :

6-1-Classification classique

- **Règne** : Plantae
- **S / règne** : Tracheobionta
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **S / Classe** : Asterdae
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae
- **Genre** : *Thymus*
- **Espèce** : *Thymus vulgaris*

6-2- Classification phylogénétique : selon (Negre ,1972)

- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae

7-Propriétés du thym

- Assaisonnement des aliments et des boissons.
- Antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures.
- Les principaux constituants du thym montrent des propriétés vermifuges et vermicides (**Bazylko et Strzelecka, 2007**).
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) (**Jiminez Arellanes et al, 2006**).
- Propriétés anthelminthiques (**Al-Bayati, 2008**).
- Propriétés antioxydantes (**Takeuchi et al, 2004 ; Golmakani et Rezaei, 2008**) en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons *Thunnus thynnus* durant leur stockage (**Selmi et Sadok, 2008**).

8-Principes actifs du thym

Les principaux composés bioactifs reconnus dans le Thym sont :

- **Les acides phénoliques** : acide caféique (**Cowan, 1999**), acide rosmarinique (**Takeuchi et al, 2004**).
- **Les flavonoïdes** : hespéridine, eriotrécine, narirutine (**Takeuchi et al, 2004**), lutéoline (**Bazylko et Strzelecka, 2007**).
- **Les polyphénols** : tanin (**Cowan, 1999 ; Zcan et Chalchat, 2004**).

9-Composition chimique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* :

Le thymol présente la teneur la plus élevée de *Thymus vulgaris* et de l'ordre 41,4 %, ³-terpinène 22,25% et p-cymène 15,59% (**tableau 3**). La fraction mono terpénique prédomine avec de 97,35%, constituée de 46,5% sous forme d'hydrocarbures et 50,85% sous forme de composés oxygénés. Cette dernière a été trouvée chez la même espèce cultivée au Cameroun, en quantité plus importante avec

un pourcentage de 93,9%, dont la proportion en mono terpènes hydrocarbonés sensiblement identique (45,0%), et même pour les monoterpènes oxygénés (48,9%), le principal constituant de la fraction oxygénée est le thymol (40,1%) (**François T et al.,2009**), ce qui est en accord avec le résultat obtenu.

D'après (**Roman P,2009**) les analyses ont montré que les substances majoritaires pour *Thymus vulgaris* étaient le thymol 60,3% et le p-cymène à 10,1%. Les hydrocarbures sesquitépéniques ne représentent qu'un faible pourcentage (1,7%). (**Pino et al. ;1997**) , ont rapporté avoir extrait un échantillon caractérisé par un fort taux de thymol (34,6 %), de ³-terpinène (17,6 %) et de p-cymène (17,6 %). En revanche, ils diffèrent de ceux publiés par (**Naguib N,2002**) dont l'essence se caractérise plutôt par une forte teneur en thymol (36,6 %), \pm - thujone (23,2 %) et 1,8-cinéole (13,4 %). (**Alexandre et al. ;2008**) ont rapporté également que le thymol (44,77%), p-cymène (18,6%) et ³-terpinène (16,5%) sont des substances majoritaires de *Thymus vulgaris* cultivé au Rio de Janeiro State (Brazil).

Tableau 4. Composition chimique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysée par CPG-SM

Composés chimiques	Indice de rétention	Pourcentage %	Références		
			(François T et al.,2009)	(Roman P, 2009)	(Pino et al.; 1997)
Monoterpènes	–	97,35%	93,9%,	–	–
Monoterpènes hydrocarbonés	–	46,5%	45,0%	–	–
p-cymène	1020	15,59	–	10,1	17,6
³ -terpinène	1054	22,25	–	–	17,6
Monoterpènes oxygénés	–	50,85%	48,9%	–	–
Thymol	1289	41,39	40,1	60,3	34,6
Thymol methyl ether	1232	1,18	–	–	–

9-2 Les chémotypes

Selon (Bonnier et al., 1990) le thym est divisé en plusieurs « races » chimiques, appelées chémotypes ou chimiotypes. La variabilité de ce dernier est influencée par l'environnement (sol, altitude) et le climat (température et ensoleillement) permettant à la plante de vivre et d'évoluer.

- ❖ le chémotype thymol se retrouve dans tous les types de sols où le thym peut évoluer, des sols extrêmement chauds et secs aux sols plus humides. La spécificité thymol est la plus répandue, mais l'est de façon moins homogène, et elle est souvent associée à d'autres chémotypes.
- ❖ le chémotype carvacrol se retrouve surtout dans des conditions d'extrême chaleur et d'extrême sécheresse.
- ❖ le chémotype linalol se retrouve dans toutes les ères du thym, essentiellement en zone de moyenne montagne dans des zones à humidité atmosphérique importante.
- ❖ le chémotype thuyanol, moins abondant, est un intermédiaire entre le linalol et géraniol
- ❖ le chémotype géraniol, peu abondant est adapté aux conditions d'altitude rudes (1 000 m)
- ❖ le chémotype paracymène est un précurseur de la biosynthèse végétale du carvacrol et du thymol.

10-Usages médicaux

Les feuilles de thym commun sont utilisées sous forme d'infusion, d'huile essentielle. De manière générale, le thym est un anti-infectieux à large spectre, un stimulant immunitaire et circulatoire, un expectorant et un digestif. La composition moléculaire de ce thym lui confère des propriétés différentes. Certains chémotypes sont plus adaptés à certains usages plus spécifiques, en raison de l'agressivité et le dermocausticité de leur propriétés (Bonnier et al., 1990):

- ❖ Le thym à thymol s'utilise en cas de fatigue générale, est un anti-infectieux et s'utilise dans le traitement de l'asthme, des dermites irritatives et de la couperose.
- ❖ Le thym à géraniol est un antifongique, un antiviral et un antibactérien. C'est également un cardiotonique. Il s'utilise en cas de bronchite et d'entérite virale. Il est aussi utilisé dans les accouchements.
- ❖ Le thym à linalol, est quant à lui, un antifongique dans les cas d'infection par *Candida albicans*. C'est également un vermifuge. De par sa moindre agressivité, ce chémotype est préféré pour les traitements concernant les enfants.
- ❖ Le thym à paracymène est un antalgique s'utilisant principalement dans le traitement des rhumatismes et de l'arthrose.
- ❖ Le thym à thujanol est un bactéricide (en particulier dans le cas de chlamydia) ainsi qu'un viricide.

11- Usages culinaires

Lambinon *et al.*, (2012), ont montré que le goût typé de *thymus vulgaris* est différent selon le terroir à tel point qu'on a donné aux différentes variétés le nom du pays où il croît. Il peut avoir un arrière-goût citronné ou un parfum de verveine. Il donne une touche méditerranéenne à tous les plats, que ce soit la tomate, la grillade, le fromage de chèvre, la terrine, les pâtes et les plats mijotés. Il entre dans le classique bouquet garni. Dans une marinade, il parfume aussi bien les légumes que la volaille et la charcuterie, le poisson que le gibier. Ce type d'usage est fréquent dans la cuisine créole de La Nouvelle-Orléans. Il fréquente avec plaisir l'ail, l'olive et les sauces au vin et entre dans la composition des farces. Le thym aromatise également l'huile ou le vinaigre, préalablement chauffés. Il est aussi à la base de liqueurs.

12- Autres usages du thym

L'huile essentielle est utilisée en parfumerie, ainsi que les herbivores sont friands de cette plante, qui est particulièrement recherchée par les lapins, les lièvres et les chèvres (Lambinon *et al.*, 2012).

13-Culture de *Thymus vulgaris*

En horticulture, la propagation ou multiplication du thym se fait au printemps. Cette production se développe également par semis, dans ce cas, les semences prennent deux à trois semaines à lever, la croissance est rapide et le repiquage s'effectue, lui deux mois après, avec un espace de 25 à 30 cm entre les plants. La division des touffes et des racines ainsi que le bouturage et le marcottage sont d'autres techniques culturales appropriées. On évitera les engrais durant l'été (sans pour autant le cultiver dans une terre trop pauvre !) qui risqueraient, par un apport excédentaire, de rendre la plante trop fragile à l'époque des gelées, et les arrosages d'appoint. On pourra pailler avec des pierres plutôt qu'avec de la matière organique, ce qui augmentera la chaleur à son pied et réduira les risques de pourriture. On devra aussi penser à couper la plante de moitié au printemps pour favoriser l'apparition de nouvelles pousses. On pourrait aussi les semer au printemps en rang et les éclaircir à 15 cm. Il est conseillé de renouveler, de faire une bouture ou de marcotter les plants tous les trois ans sinon la tige devient trop ligneuse et les feuilles perdent leur arôme (**Lambinon et al.,2012**).

Pour une culture intérieure, le thym a besoin d'au moins 5 heures de soleil par jour ou de 12 heures de lumières artificielles. Le terreau devra être constitué de compost, de gros sable et de morceaux de calcaire. On attendra que la terre devienne sèche avant de procéder à l'arrosage. On peut alors utiliser son thym de façon régulière, sinon tailler les extrémités chaque mois(**Lambinon et al.,2012**).

Les tiges sont réunies en bouquets, qui sont suspendus, l'inflorescence en bas dans des locaux chauds, secs, aérés et ombragés. Après séchage complet, on procède au battage sur une toile cirée pour détacher les feuilles des branches. On conserve ensuite la plante dans un contenant hermétique, en évitant les matières plastiques pour éviter une perte des huiles essentielles par absorption par le plastique (**Lambinon et al.,2012**).

13-Période de récolte

Selon **Bonnier et al .,(1990)** deux récoltes peuvent être entreprises, une en fin mai, début juin au commencement de la période de floraison, l'autre en septembre. Les branches doivent être coupées jusqu'à 5 cm du sol ; et si l'on coupe les branches à la fin de l'été, il faut éviter de couper plus bas que le tiers de la plante, car une coupe trop basse favoriserait l'apparition de jeunes pousses qui ne résisteraient pas aux premiers froids.

Il est conseillé de cueillir le thym dans des endroits éloignés des bords des chemins et des sentiers. Il ne faut pas arracher la plante mais plutôt lui couper les tiges au sécateur ou les casser du bout des doigts, tout en évitant de couper toutes les tiges et toutes les plantes, pour permettre la survie et la reproduction. Il suffit d'éclaircir la plante. Il est préférable de réaliser la cueillette après la rosée du petit matin et avant les heures les plus chaudes où la plante aura évacué le maximum d'humidité et n'aura pas évaporé son huile essentielle. On peut constater, que pour une récolte dans un champ, l'utilisation d'une fauche mécanique est avantageuse. Le temps consacré à la cueillette est ici amortie par du matériel adéquat ,il semblerait qu'il soit préférable de cueillir le thym, juste avant la période de floraison (**Bonnier et al .,1990**).

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 proposé d'essayer de connaître le comportement *in vitro* des souches de levains lactiques vis-à-vis des inhibiteurs de croissance tels les poly phénols, 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 l'Ethanol.

2- Suivre les effets antimicrobiens de l'extrait à l' Ethanol 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 l'Ethanol 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 SETIF au sud d'Algérie. Un échantillon de 2 à 3 kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce *Thymus vulgaris* L récoltée au mois de mai dans la région de «El Mawan» commune d'Ouricia, wilaya de Sétif.

Les échantillons séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante (Catier et Roux, 2007). Après séchage, les parties aériennes ont été broyées et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leurs analyses (Figure 06).



Figure 06. Zone de prélèvement du matériel végétal (données cartographique, Google Maps, 2017).

La matière végétale à 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 (Figure 07) .



Figure07. Matière végétale broyée de *Thymus vulgaris*.

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 à été réalisée par usage de l'éthanol comme solvant d'extraction. Elle à été 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 à été 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 (Figure 08).

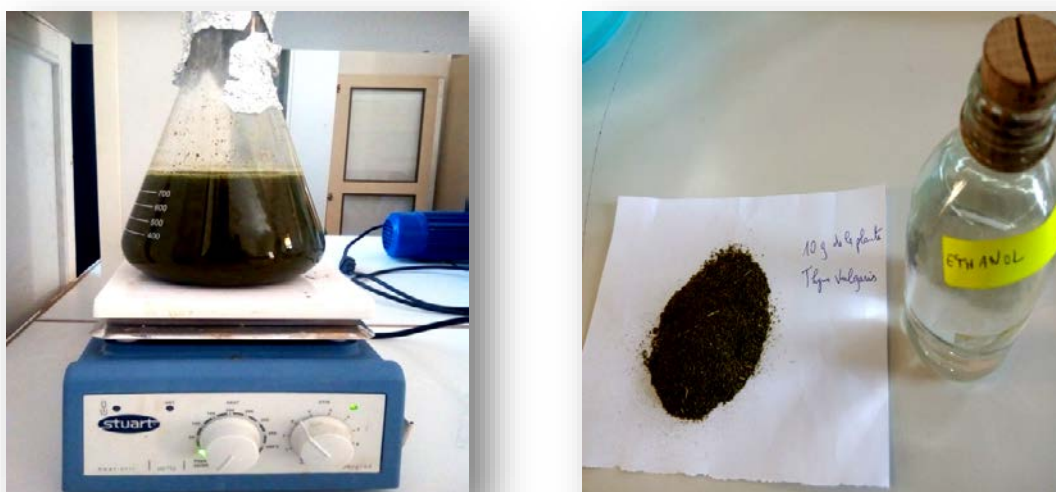


Figure 08. L'extraction par macération.

Les extraits hydro alcooliques obtenus ont été filtrés en utilisant un papier filtre Wattman ayant une porosité de 0,2 μ m (**Figure 09**) et débarrassés des solvants par évaporation sous vide à 45 °C (**Figure 10**).



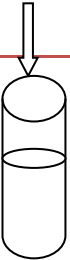
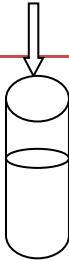
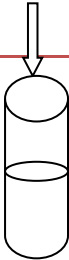


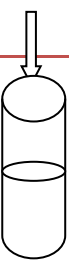
Figure 09. Méthode de filtration des extraits hydro alcooliques de *Thymus vulgaris* .

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



Figure10 .Méthodes d'extractions des composé bioactif.

Tableau 5 .Concentrations des extraits de *thymus vulgaris* obtenus par macération.

Solution	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Quantité d'extrait aqueux pure riche en composé bioactif	00ml	02ml	04ml	06ml	08ml	10ml
Quantité d'eaux distillée	10ml	08ml	06ml	04ml	02ml	00ml
Ajoute dans des tubes stériles						

4. Etude des effets antimicrobiens des extraits de thym

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 à 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 préalableensemencée 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 à été pris pour êtreensemencée 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.

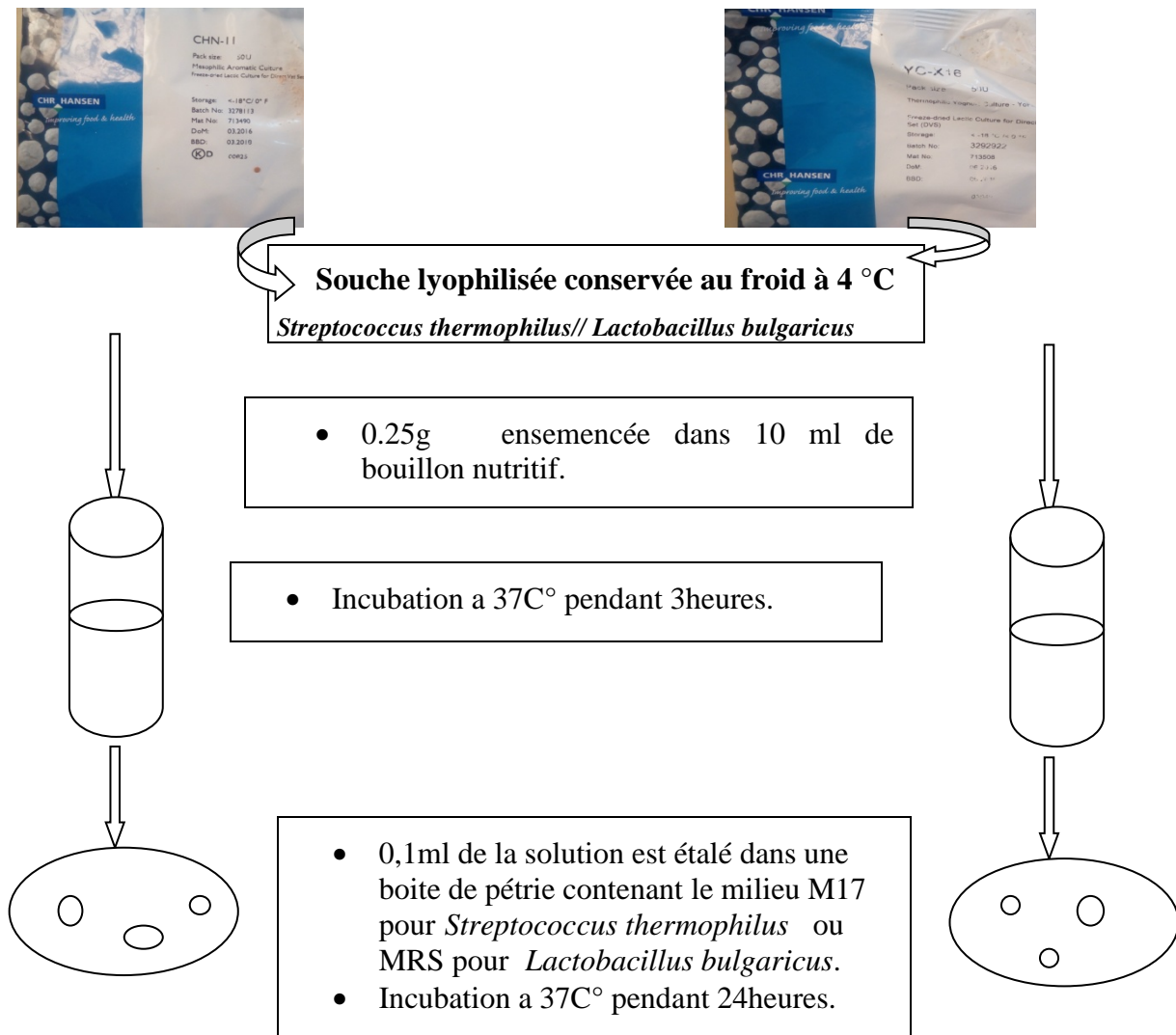


Figure 11 .Activation des deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

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 à été prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile. Chacune à été ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif suivant d'une incubation à 37°C durant 03 heures. A partir de ces dernières solutions dont chacune constitue une solution mère d'une espèce de bactérie lactique donnée des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant à 10^{-4} pour respectivement les *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus bulgaricus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale ont été 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 développées a été effectuée après incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures (Bourgeois et Leveau, 1980).

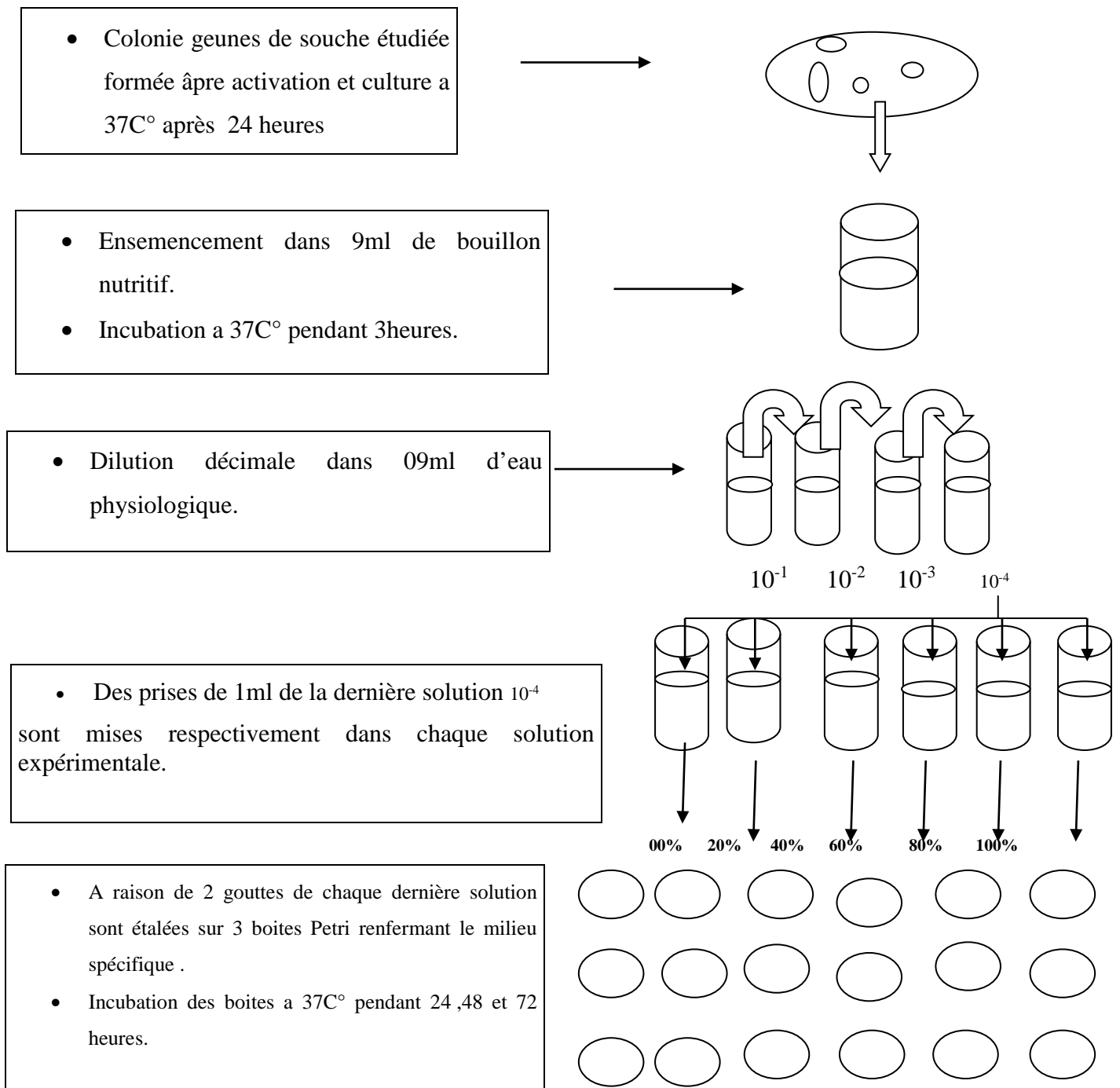


Figure 12. Méthodes de contact direct.

4.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose

Les disques ont été confectionnés à partir de papier filtre (Wattman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours

de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave (**Figure13**).

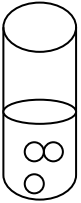
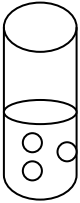
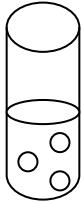
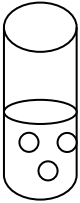
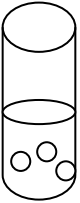
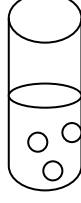
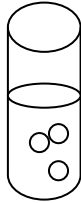


Figure13 .Disque préparés à partir de papier filtre Wattman.

Une colonie de chaque espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation à été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif ; ce mélange constitue la solution mère. Des prises de volume de 1ml de cette dernière solution ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MRS ou M17 selon l'espèce microbienne étudiée. Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Pénicilline, ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé spécifique ensemencé au germe lactique approprié (**Prescott et al., 2003**).

La lecture des diamètres d'inhibition à été 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**).

Tableau 6. Etape d'immersion des disques dans les solutions d'extraits de *thymus vulgaris* et la pénicilline.

Solution expérimentales	100%	80%	60%	40%	20%	00%	Pénicilline
Quantité d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i>	10ml	08ml	06ml	04ml	02ml	00ml	10ml
Quantité d'eau distille stérile	00ml	02ml	04ml	06ml	08ml	10ml	
Ajoute des disques à raison de 3 disques							

- Colonie jeune d'espèce étudiée formée après activation et culture à 37°C durant 24 heures.

- Ensemencement dans 10ml de bouillon nutritif.
- Incubation 37°C pendant 03 heures.

Etaler 01ml dans chaque boîte qui contient le milieu gélose de Muller Hinton.

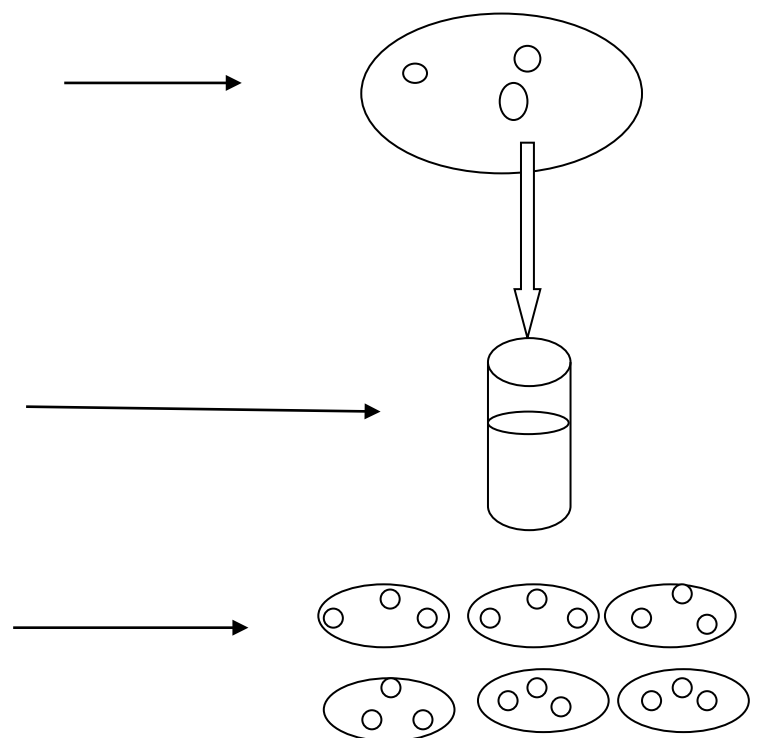


Figure 14. Méthodes des disques.

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 à l'éthanol qui ont été 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 sera incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir les inocula. Des prises de 0,2 ml de chaque inoculum seront introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton.

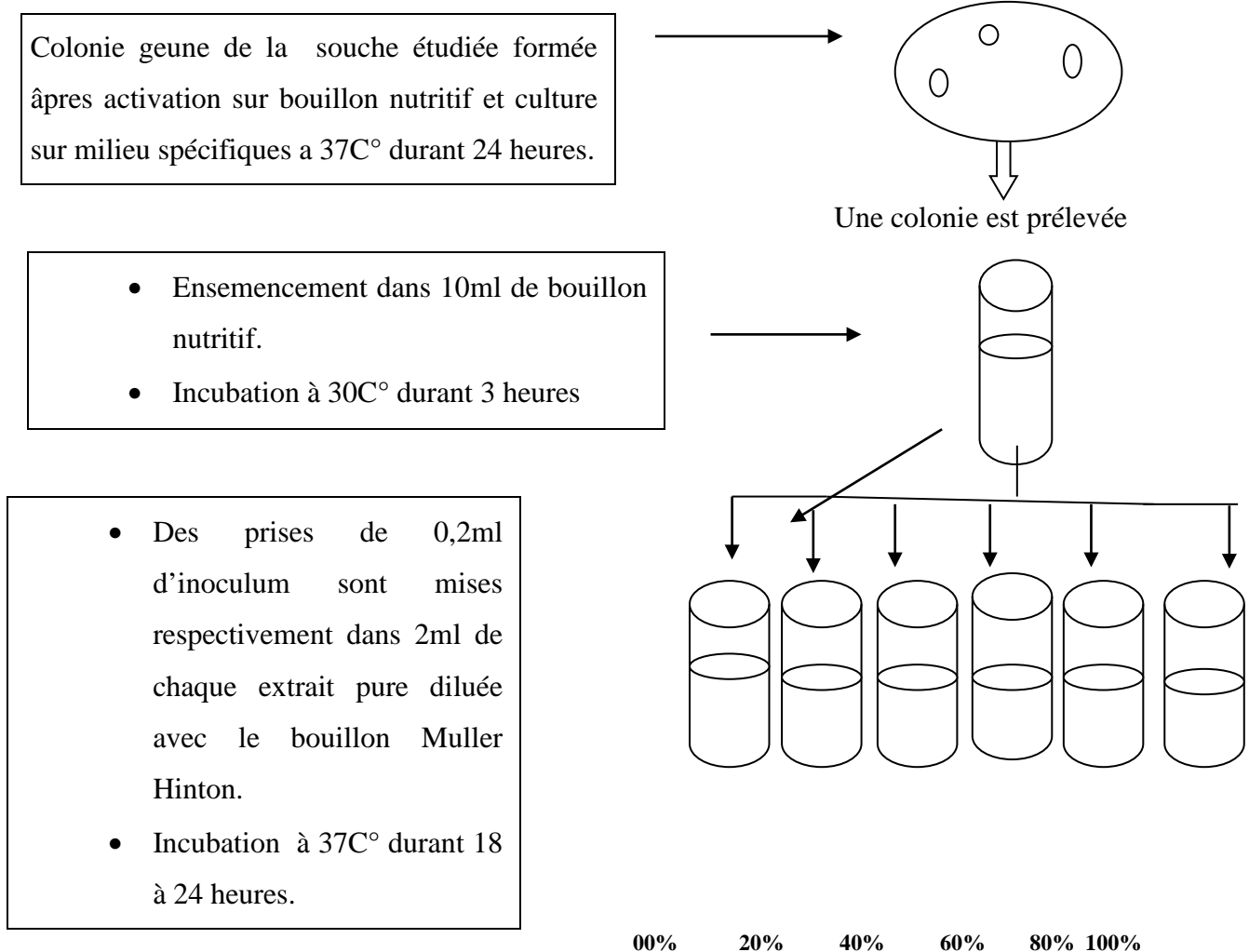


Figure 15 .Méthode de la détermination de la CMI des extraits expérimentaux sur la croissance des souches étudiées.

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 ont été ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**Moroh et al., 2008**).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI à 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 sera mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

$$s = \frac{d_f - d_i}{D_f - D_i} \cdot 100.$$

- S : Taux de survie du microorganisme en %.
- $d_f - d_i$: différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.
- $D_f - D_i$: différence de densité optique sans extraits deMentheavant 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* étudiée 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.

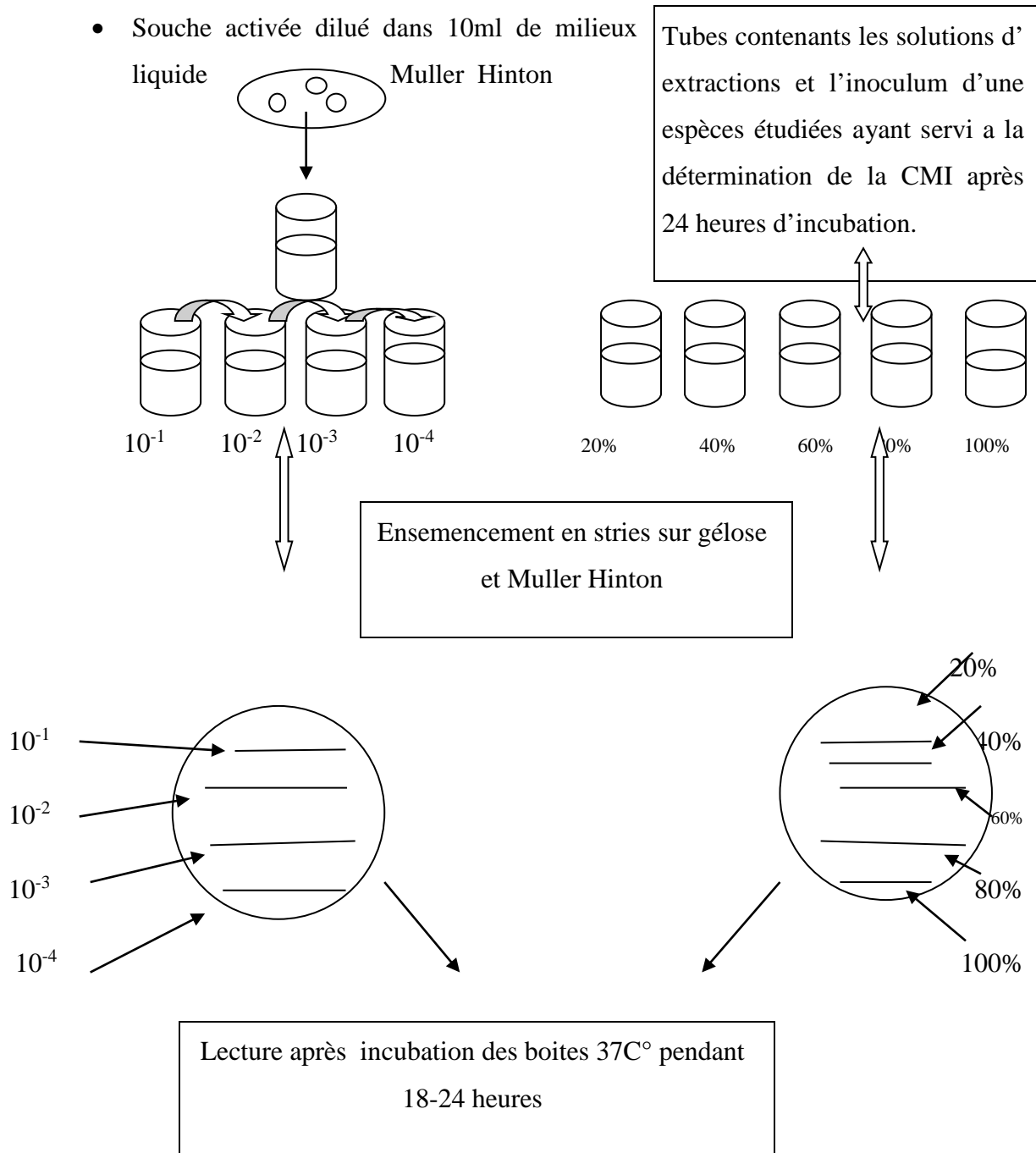


Figure 16 .Méthode de la détermination de la CMB (Concentration minimales bactéricides) des espèces étudiées.

5. Traitement statistique :

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

1-Résultats

1-*Streptococcus thermophilus*

1-1-1-Diamètres d inhibitions

Les diamètres d'inhibitions développés par les différents extraits éthanoliques à base des composés bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de l'espèce spécifique de yaourt *Streptococcus thermophilus* sont illustrés dans la (Figure 17).



a. Extrait bioactif à 20%



b. Extrait bioactif à 40%



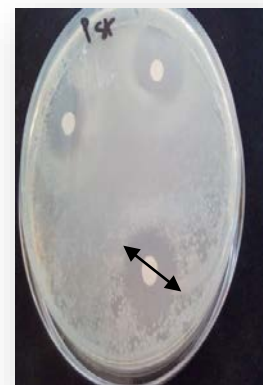
c. Extrait bioactif à 60%



d. Extrait bioactif à 80%



f. Extrait bioactif à 100%



e. Disque imbibé de pénicilline

Figure 17 .Effet des extraits bioactifs à l'éthanol de *Thymus vulgaris* préparés à (20,40, 60, 80,100)% et de la pénicilline sur le diamètre d'inhibition de la souche *Streptococcus thermophilus*.

Le diamètre d'inhibition le plus élève est obtenu avec les extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* préparés à 80 et 100% ; soit des valeurs de l'ordre de 09,33 et 09,66 mm en moyenne, ($p < 0,01$). Au contraire, les plus faibles résultats ($p < 0,01$) sont réalisés en présence des extraits dilués à (20,40,60)% 04 et 06,667 et 07,667 mm en moyenne, respectivement.

Cependant, les diamètres d'inhibition développés par les extraits de (20,40, 60,80)% au tour de l'espèce *Streptococcus thermophilus* après 24 heures de cultures s'avèrent statistiquement ($p < 0,05$) identiques. Par ailleurs, la pénicilline enregistre le meilleur diamètre d'inhibition (13,33mm), par comparaison aux différents extraits expérimentaux.

L'analyse des variances montre l'effet prépondérant des différentes solutions d'extraits de *Thymus vulgaris* sur la variation des diamètres d'inhibition chez *Streptococcus thermophilus* (**Tableau 7**).

Tableau 7. Effet des différentes dilutions des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur les variations des diamètres d'inhibition chez *Streptococcus thermophilus* (mm, $\bar{X} \pm \sigma$, n = 3) .

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupe homogènes			Effet des concentrations d'extrait de l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
100%	09,66	3,36		b		** ($P < 0,01$)
80%	09,33	1,15		b		
60%	07,66	2,08		b	c	
40%	06,66	0,57		b	c	
20%	04	1,52			c	
Pénicilline	13,33	0,57	a			

Note : ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée : concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; \bar{x} : Moyenne ; σ : Ecart type ; n : Nombre de répétition ; P : Seuil de probabilité ; a, b, c : Groupe homogènes des comparaisons des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-1-2-Taux d'inhibition

La variation des taux d'inhibitions de *Streptococcus thermophilus* est marquée tout d'abord par des taux relativement trée élèves ($P < 0,01$) allant de 72,50% à 70,00 et à 57,70% respectivement pour les extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* préparé a (100 ,80 et 60)% successivement .Par contre les faibles taux d'inhibition ($P < 0,01$) sont constatés a (40 et 20)% d'extrait de *Thymus vulgaris* ; avec des valeur respectivement de l'ordre de 50,00% et 30,00%.

L'analyse de la variance montre l'effet majeur de la solution d'extrait de Thym de *Thymus vulgaris* sur les variation des taux d'inhibitions des l'espèce bactérienne spécifique de yaought *Streptococcus thermophilus* (**Tableau 8**).

Tableau 8. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la variations des taux d'inhibitions chez *Streptococcus thermophilus* ($\text{mm}, \bar{X} \pm \sigma$, n = 3) .

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Taux d'inhibition (%)	Ecart type	Groupe homogènes			Effet des concentrations d'extrait de l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
100%	72,50	11,45		b		* ($P < 0,05$)
80%	70,00	4,33		b		
60%	57,50	15,61		b		
40%	50,00	8,66		b	c	
20%	30,00	25,98			c	
Pénicilline	100	00	a			

Note : ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée : concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; \bar{x} : Moyenne ; σ : Ecart type ; n: Nombre de répétition ; P : Seuil de probabilité ; a, b , c : Groupe homogènes des comparaison des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-1-3-Méthode de contact direct

L'effet des déférentes solutions d'extrait bioactifs sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* sont représentés à travers la (**Figures 18**).

Les extraits à l'éthanol de Thym préparé a 20 et 40 % révèlent de faibles taux ($P < 0,01$) de croissance de *Streptococcus thermophilus* par rapport a celui de témoin a base de l'eau distillée stérile $111. 10^5$ et $89. 10^5$ vs $140. 10^5$ UFC/ml.

La prolifération de ce microorganisme continue à diminuer ($P < 0,01$) en présence d'extrait bioactifs préparés a 60% ; 54.10^5 UFC/ml. Par ailleurs, les solutions d'extractions préparées a 80% ont exerce une action bactéricide sur *Streptococcus thermophilus* ; ainsi aucun développement de cette espèce n'a été observés.



a. Extrait bioactif à 00%



b. Extrait bioactif à 20%



c. Extrait bioactif à 40%



d. Extrait bioactif à 60%



e. Extrait bioactif à 80%



f. Extrait bioactif a 100%

Figure 18. Effet des extraits bioactifs de Thym sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

L'analyse de variance dévoile l'effet inhibiteur très significatif des solutions d'extraits de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* (**Tableau9**).

Tableaux 9. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* ($\overline{mm, X} \pm \sigma$, n = 3) .

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Nombre de colonies (UFC/ml)	Groupe homogènes					Effet des concentrations d'extrait de l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
100%	00					e	** (P<0,01)
80%	00					e	
60%	54. 10 ⁵				d		
40%	89. 10 ⁵			c			
20%	111. 10 ⁵		b				
00%	140. 10 ⁵	a					

Note : ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée :concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; x : Moyenne ; σ : Ecart type ; n:Nombre de répétition ; P :Seuil de probabilité ; a,b ,c :Groupe homogènes des comparaison des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-1-4-Concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'extrait bioactifs préparé a 20% et 40% laisse un taux de survie de l'espèce bactérienne de *Streptococcus thermophilus* d'environ 55 ,34% et 40,31% alors qu'a des taux d'extraits des composés bioactifs supérieurs ce microorganisme s'avère incapable de survivre après 18 heures d'incubation a 37C°.

C'est a partir de l'extraits préparé à 60% que la croissance de *Streptococcus thermophilus* s'annule d'une manière absolue ; cette concentration est retenue comme étant la concentration minimale inhibitrice (**Tableau 10,Figure 19**).

Tableau 10. Evaluation de la concentration minimale bactéricide des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Paramètres	Témoin	Concentration d'extraits bioactifs à l'éthanol de de <i>Thymus vulgaris</i>				
		20%	40%	60%	80%	100%
di (DO)	0,04	1,25	2,52	3,00	3,00	3,00
df (DO)	0,30	1,39	2,62	2,55	3,00	3,00
df-di (DO)	0,25	0,14	0,10	-0,44	00	00
S (%)	100%	55,34%	40,32%	00	00	00
CMI	CMI=60%					

df : Densité optique après incubation ; di : Densité optique avant incubation, CMI : Concentration minimale inhibitrice ; S(%) : Pourcentage de survie .

1-1-5. Concentration minimale bactéricide (CMB)

A travers la (Figure 20), il apparaît que l'extraite préparé a 20% et 40% n'a pas inhibé totalement la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Cependant, l'extraits a 60% a engendrée un pourcentage de survie proches de 0,01% de l'espèce bactérienne expérimentale ; cette solution a base des composé bioactifs de Thym constitue donc la CMB.

Il résulte enfin, à partir du rapport CMB/CMI obtenue et qui est égale à 01 que l'extraite expérimentale exerce un effet inhibiteur de type bactéricide sur l'espèce étudiée *Streptococcus thermophilus*. (Figure 20, Tableau 11).



Figure 19. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* .

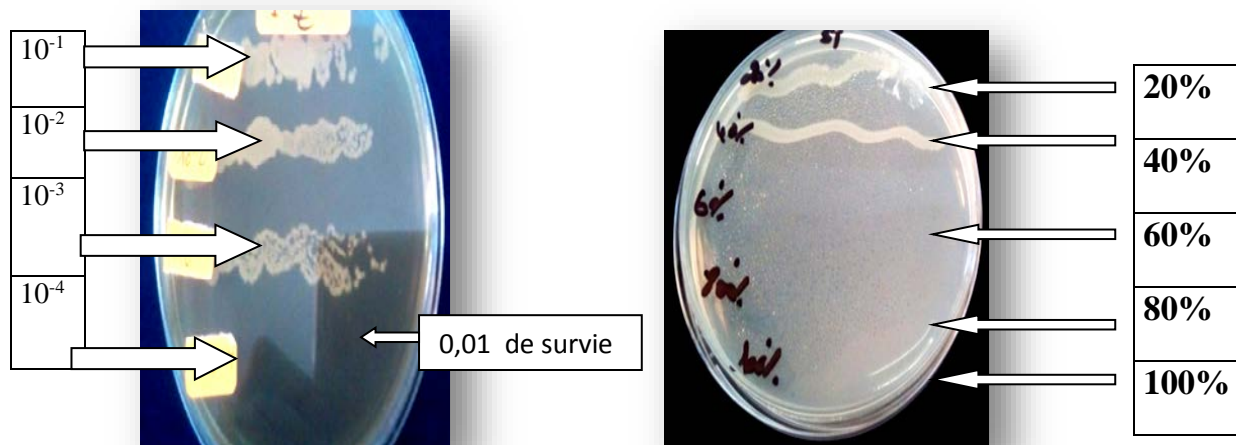


Figure 20. Déterminations de la CMB de l'extrait bioactifs de Thym sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* .

Tableau 11. Action inhibitrice des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Désignation	CMB	CMI	CMB/CMI	Type d'inhibition des extraits bioactifs
Solution active d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i>	60%	60%	01	Bactéricide
Normes	<ul style="list-style-type: none"> • D'après (Oliver, 2007) : <ul style="list-style-type: none"> { CMB/CMId2 (Effet bactéricide). { CMB/CMIE2 (Effet bactériostatique). • D'après (Marmonier, 1990) : <ul style="list-style-type: none"> { CMB/CMId4 (Effet bactéricide). { CMB/CMIE4 (Effet bactériostatiques). 			

2-1-Lactobacillus bulgaricus

1 -2-1 Diamètres d inhibitions

Les diamètres d'inhibitions développés par les différents extraits éthanolique à base de composés bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance des de l'espèce spécifique de yaourt *Lactobacillus bulgaricus* sont illustrés dans la (Figure 21).

Le diamètre d'inhibition le plus élève est obtenu avec les extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* préparé à 100% ; soit une valeur de l'ordre de 10,33mm ,en moyenne ($p < 0,01$) le dernier diamètres d'inhibition de l'extrait pure pur de *Thymus vulgaris* est comparable à celui de la pénicilline ($p < 0,05$) ;12,67mm ,en moyenne .Au contraire, les plus faibles résultats ($p < 0,01$) sont réalisés en présence des extraits dilués à 20 et 40 ,60 % ; 04,33 et 06, 33 mm, en moyenne respectivement.

Par ailleurs, les diamètres d'inhibitions développées par les extraits préparés à de 60 et 80% au tour de l'espèce *Lactobacillus bulgaricus* après 24heures de cultures s'avèrent statistiquement ($p < 0,05$) identiques et proches de l'extrait pur ($p < 0,01$) ;7,33 vs 7,66 vs 10,33 en moyenne .

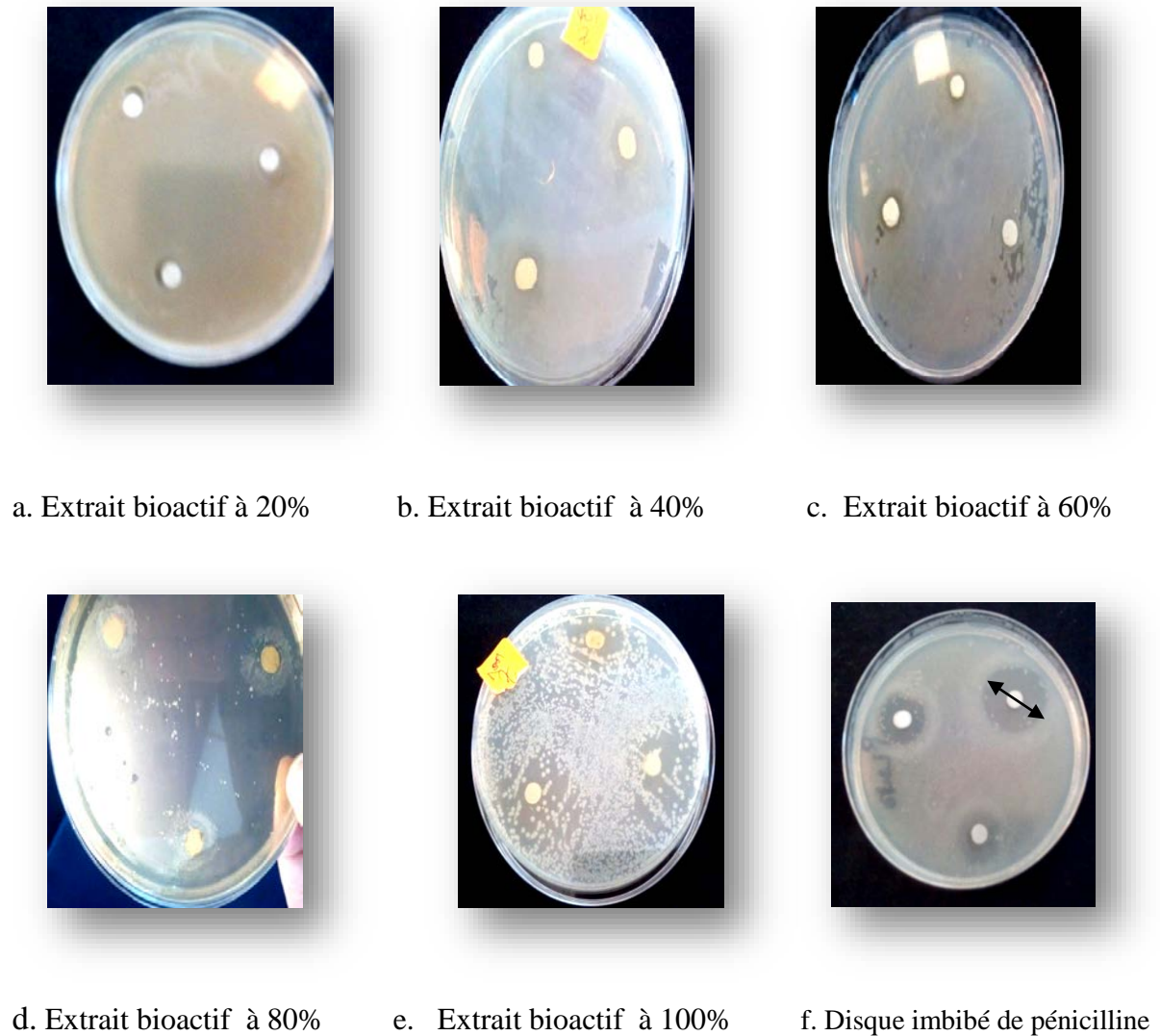


Figure 21 .Diamètres d’inhibition des extraits bioactifs préparés à (20,40, 60, 80,100)% et de la pénicilline sur la souche *Lactobacillus bulgaricus*.

L’analyse des variances montre l’effet prépondérant des différentes solutions d’extraits de *Thymus vulgaris* sur les variations des diamètres d’inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus* (**Tableau 12**).

Tableau 12. Effet des différentes dilutions d'extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur les variations des diamètres d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus* (mm, $\bar{X} \pm \sigma$, n = 3) .

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupe homogènes			Effet des concentrations d'extraction à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
			a	b	c	
100%	10,33	3,78	a	b		** (P<0,01)
80%	07,66	0,57		b	c	
60%	07,33	0,57		b	c	
40%	06,33	0,57		c		
20%	04,33	0,57		c		
Pénicilline	12,66	0,57	a			

Note : ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée : concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; x : Moyenne ; σ : Ecart type ; n: Nombre de répétition ; P : Seuil de probabilité ; a, b, c : Groupe homogènes des comparaisons des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-2-2- Taux d'inhibition

La variation des taux d'inhibitions de *Lactobacillus bulgaricus* est marquée tout d'abord par des valeurs relativement trée élèves (P<0,01) allant de 81,57% à 60, 52 et à 57,89% respectivement pour les extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* préparés à 100 ,80 et 60% ; successivement .Par contre, les faibles taux (P<0,01) sont constatés à 20 et 40% d'extrait de *Thymus vulgaris* ; avec des valeurs de l'ordre de 34,20% et 49,99%.

L'analyse de la variance montre l'effet majeur de la concentration d'extraits de Thym (*Thymus vulgaris*) sur la variation des taux d'inhibitions des l'espèce bactérienne spécifique du yaought *Lactobacillus bulgaricus* (**Tableau 12**).

Tableau 12. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur les variations des taux d'inhibitions chez *Lactobacillus bulgaricus* (mm, $\bar{X} \pm \sigma$, n = 3).

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Taux d'inhibition (%)	Ecart type	Groupe homogènes			Effet des concentrations d'extraction à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
			a	b	c	
100%	81,576	29,888	a	b		* (P<0,05)
80%	60,524	4,558		b	c	
60%	57,893	4,558		b	c	
40%	49,998	4,558			c	
20%	34,209	4,558			c	
Pénicilline	100	00	a			

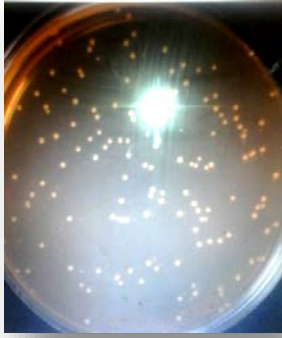
Note : ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée : concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; x : Moyenne ; σ : Ecart type ; n : Nombre de répétition ; P : Seuil de probabilité ; a, b, c : Groupe homogènes des comparaisons des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-2-3-Méthode de contact direct

Les effets des différentes solutions d'extrait bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* sont représentés à travers la (Figures 22).

Les extraits de Thym préparés à 20% et 40% révèlent un faible taux (P<0,01) de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* par rapport à celui du témoin à base d'eau distillée stérile ; $90. 10^5$ et $88. 10^5$ vs $137. 10^5$ UFC/ml, en moyenne.

La prolifération de ce microorganisme continue à diminuer (P<0,01) en présence d'extrait bioactifs préparés à 60%, 59.10^5 UFC/ml. Par ailleurs, les solutions d'extrait à l'éthanol préparées à plus de 80% ont exercé une action de type bactéricide sur *Lactobacillus bulgaricus* ; ainsi aucun développement de cette espèce n'a été observés.



a. Extrait bioactif à 00%



b. Extrait bioactif à 20%



c. Extrait bioactif



e. Extrait bioactif à 60%



f. Extrait bioactif à 80%



d. Extrait bioactif à 100%

Figure 22. Effet des extraits bioactifs de Thym sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

L'analyse de variance dévoile l'effet inhibiteur très significatif des solutions d'extraits de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaris* (**Tableau13**).

Tableaux 13. Effet des différents dilutions d'extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* ($\text{mm}, \bar{X} \pm \sigma$, $n = 3$).

Concentration d'extrait éthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	Nombre de colonies (UFC/ml)	Groupe homogènes				Effet des concentrations d'extraction à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>
100%	00				d	** (P<0,01)
80%	00				d	
60%	59. 10 ⁵			c		
40%	88. 10 ⁵		b			
20%	90. 10 ⁵		b			
00%	137. 10 ⁵	a				

Note **: Effet hautement significatif du facteur étudiée : concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* ; \bar{x} : Moyenne ; σ : Ecart type ; n: Nombre de répétition ; P : Seuil de probabilité ; a, b, c : Groupe homogènes des comparaison des moyennes deux à deux selon le teste de Newman et keuls .

1-2-4-Concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'extrait bioactifs préparé à 20 , 40% et 80% laisse un taux de survie de l'espèce bactérienne de *Lactobacillus bulgaricus* d'environ 89 et 49, 50 et 0,50% respectivement ; alors qu'a des taux d'extraits des composés bioactifs supérieurs ce microorganisme s'avère incapable de survivre après 18 heures d'incubation à 37°C.

C'est a partir de l'extraits préparé à 80% que la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* s'annule d'une manière absolue ; cette concentration est retenue comme étant la concentration minimale inhibitrice (**Tableau 14, Figure 23**).

Tableau 13. Evaluation de la concentration minimale bactéricide des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Paramètres	Témoin T (00%)	Concentration d'extraits bioactifs à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>				
		20%	40%	60%	80%	100%
di (DO)	0,021	2,622	2,628	2,898	3,000	3,000
df (DO)	0,221	2,800	2,727	2,900	3,000	2,811
df-di (DO)	0,200	0,178	0,099	0,001	00	-0,189
S (%)	100%	89%	49,50%	0,50%	00	00
CMI	CMI=80%					

df : Densité optique après incubation ; di : Densité optique avant incubation ; CMI : Concentration minimale inhibitrice ; S(%) : Pourcentage de survie.

1-2-5-Concentration minimale bactéricide (CMB)

A travers la (Figure 23), il apparaît que l'extraite préparé a 20, 40,60 et 80% n'a pas inhibé totalement la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*. Cependant, l'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* préparés à 40% a engendrée un pourcentage de survie proches de 0,01% de l'espèce bactérienne expérimentale ; cette solution a base des composé bioactifs de Thym constitue donc la CMB.

Il résulte enfin, à partir du rapport CMB/CMI obtenue et de l'ordre de 1,25 l'extrait expérimentales exerce un effet inhibiteur de type bactéricide sur l'espèce étudiée *Lactobacillus bulgaricus*. (Figure 24, Tableau 14).



Figure 23. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* .

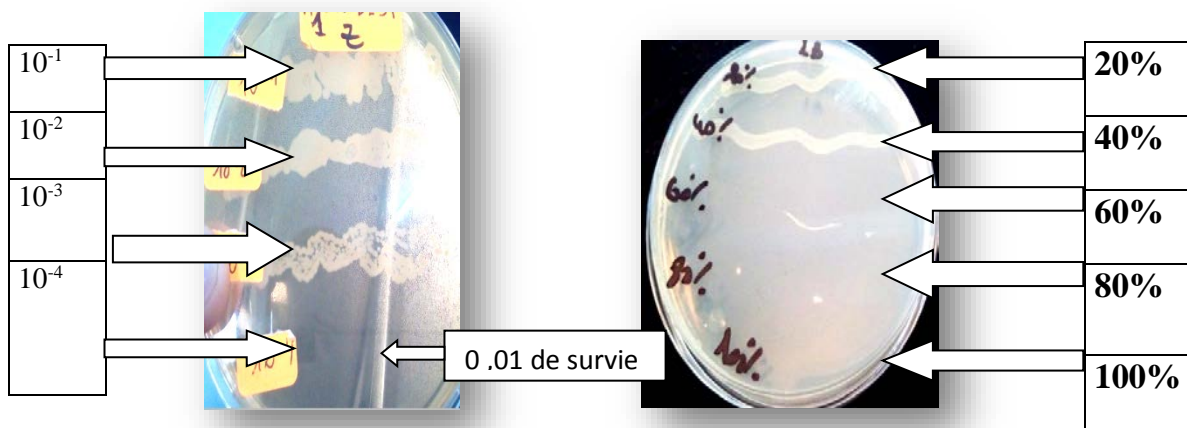


Figure 24. Déterminations de la CMB de l'extrait éthanoliques bioactifs de Thym sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Tableau 14. Action inhibitrice des extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

Désignation	CMB	CMI	CMB/CMI	Type d'inhibition des extraits bioactifs
Solution active d'extrait de <i>Thymus vulgaris</i>	100%	80%	01,25	Bactéricide
Normes	<ul style="list-style-type: none"> • D'après (Oliver, 2007) : <ul style="list-style-type: none"> { CMB/CMId2 (Effet bactéricide). { CMB/CMIE2 (Effet bactériostatique). • D'après (Marmonier, 1990) : <ul style="list-style-type: none"> { CMB/CMId4 (Effet bactéricide). { CMB/CMIE4 (Effet bactériostatiques). 			

2 -Discussion

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait bioactif de *Thymus vulgaris* sur la croissance *in-vitro* de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* deux bactéries spécifiques de yaourt (**Makhloufi., 2012**).

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de contrôle la croissance, des deux germes est inversement proportionnel à la concentration de l'extrait à l'éthanol de Thym.

Les extraits de Thym ont induit des diminutions hautement significatives ($P < 0,01$) sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Par comparaison au témoin, la régression de la croissance de ces deux espèces bactérienne étudiée commence à apparaître à 20% et 40% ; mais devient importantes surtout à 60% de l'extrait. Par ailleurs, aucun développement des *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* n'est observé en présence des extraits préparés à 80% et 100%. Ceci est certainement à l'effet antibactérien qu'exerce les extraits bioactifs sur les deux espèces étudiées.

En effet, plusieurs auteurs ont confirmé la présence de plusieurs composés bioactifs dans le Thym et qui possèdent un effet d'inhibition avéré contre de nombreux microorganismes (**Bazylo et Strzelecka, 2007**).

L'analyse de cette espèce végétale montre qu'elle renferme principalement des huiles essentielles dont le thymol, mais aussi les composés phénoliques (**Cowan, 1999**) et les flavonoïdes (**Takeuchi et al, 2004**).

De même, les extraits à éthanol de *Thymus vulgaris* récoltés dans la région de Setif et préparés à 80 et 100 % ont exercé un fort taux d'inhibition à l'égard de *Streptococcus thermophilus* malgré que son pouvoir inhibiteur reste faible à la pénicilline. Par ailleurs l'extrait pur de Thym s'avère présenter un pouvoir inhibiteur comparable à celui de la pénicilline chez l'espèce microbienne *Lactobacillus bulgaricus*.

Ainsi nos résultats montrent que l'extrait bioactif à divers concentrations et manifeste une activité antibactérienne certaine sur la croissance *in-vitro* de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* selon une relation dose-réponse. Cela nous permet de déterminer les différents paramètres antibactériens de l'extrait contre les deux espèces

étudiées à savoir la concentration minimale inhibitrice(CMI) et la concentration minimale bactéricide(CMB).

L'analyse de la CMI et la CMB montre que *Streptococcus thermophilus* est sensible à 60% d'extraits bioactifs de Thym avec un rapport de (CMI/CMB=1) par contre *Lactobacillus bulgaricus* est sensible à 100% avec un rapport de (CMI/CMB=1,25). D'après **(Oliver,2007)** étant donné que ce rapport est inférieur ou égale à 2 l'extrait à l'éthanol exerce donc un effet de type bactéricide chez les deux espèces (St et Lb).**(Marmonier,1990)**,rapporte d'autre part que lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antibactérienne est inférieur ou égale à 4 ceci suppose qu'elle présente un effet bactéricide ;alors que si le rapport est supérieur à 4 elle présente plutôt un effet dit bactériostatique .Ainsi d'une façon globale , les extraits bioactifs expérimentales semblent exercer un effet bactéricide très intéressant vis-à-vis de c'est deux espèces .

Malgré que le pénicilline a présenté la même effet antibactérienne contre les deux souche étudiées que le extrait bioactifs de Thym ;cette antibiotique peut présenté néanmoins des toxicités graves surtout au niveau rénale :rétention azotée avec augmentation de l'urée sanguin et perte d'électrolyte .D'ou l'intérêt des chercher d'autre principes actifs des plante médicinales dont ceux de Thymol pouvant se substituer aux traitements conventionnelles à base notamment d'antibiotiques dans l'usage abusif peut avoir des effets secondaires sur la santé humaine **(Amboise,1998)** .

A ce propos, il est bien établi que l'efficacité thérapeutique de thymol de Thym est utilisé en cas de fatigue générale, comme anti-infectieux et pour le traitement de l'asthme **(Bonnier et al, 1990)**.

Des études *in vitro* réalisées par **(Lambinon et al., 2012)** montre aussi que le Thym à linalol est puissante , un antifongique susceptible d'être utilisé dans le cas d'infection par *Candida albicans*.

D'autres auteurs indiquent même que ses extraits a des fortes concentrations présentent un effet antiviral et antibactérien c'est également un cardiotonique, il est aussi utilisée dans les accouchements **(Bonnier et al ., 1990)** .

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez le Thym sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux

moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix *et al*, 2005**)

Ainsi, il apparaît que les extraits bioactifs de l'espèce végétale hydroéthanolique *Thymus vulgaris* récoltées dans la région de Sétif l'est d'Algérie et obtenus par extraction par macération ont inhibés la prolifération de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Les extraits bioactifs de *Thymus vulgaris* ont montré *in vitro* des effets d'inhibition significativement très élevés sur la prolifération des deux bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Le degré d'inhibition s'avère dépendre de la concentration de l'extrait bioactifs utilisé. Ainsi, plus la concentration d'extraits est importante plus les degrés d'inhibition de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* est considérable.

Le diamètre d'inhibition le plus élevés est obtenu avec l'extrait bioactifs préparés à 100% ($P < 0,01$) ; alors que les autre extraits ont présentés de faible résultats ($P < 0,01$).

Les meilleurs taux d'inhibition des deux espèces sont obtenus avec les extraits de Thym préparés à 60,80 et 100% ; ou aucune prolifération de ces deux microorganismes n'est observée.

Par ailleurs, notre étude à montre que les extraits bioactifs de Thym exercent un effet de type bactéricide vis-à-vis de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* ne présente qu'une première ébauche dans la recherche sur les effets inhibiteurs des principales substances naturelles biologiquement actives du Thym sur les deux germes spécifique du yaourt. Des essais complémentaires seront donc nécessaires et devront pouvoir d'une part confirmer les performances mises en évidence et d'autre part étudier leur effet sur les différents autres germes lactique.

D'un point de vue caractérisation chimiques des principaux constituants bioactifs que renfermant le Thym, il serait très intéressant d'approfondir ce travail expérimentales et étudier leurs effets sur les multiples germes microbiennes à l'origine surtout de certain maladie. D'un autre coté, il est aussi d'intérêts socioéconomique certain pour notre pays ainsi que pour les pays en vois de développement d'essayer d'introduire la culture de cette espèce végétale dans certaines région ou elle peut s'adapter et constituer chez la population non seulement un moyen thérapeutique à moindre cout ,mai aussi un moyen de revenue picunier intéressant .

A/

1. Alexandre P., Ronoel L., Godoy O., Chemical composition of *thymus vulgaris* L.(thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil)., *J. Serb. Chem.Soc.* 73 (3) (2008) 307-310.

2. Ammour M. S. (2004).écosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse doctorat Agrocampus Rennes.

3. ASSOUAD W., VALDEYRON Georges - Remarques sur la biologie du Thym (*Thymus vulgaris* L.) - 1975 - *biologie reproduction, thymus vulgaris, protérandrie, polymorphisme sexuel* - 4 fig., 2 tab. , p. 21-34 - Départ./Région : 32 - Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Bull. Soc. Bot. Fr. (1904), Tome 122 - Fascicule 1-2 - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°20343.

4. Axelsson. L. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.

5. Axelsson. L. (2004) .chapter lactic acid bacteria microbiological and functional aspects edition Marcel, Dekker third edition.

6. Awad, S., Hassan, A.N., and Muthukumarappan, K. (2005) Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Texture and melting properties. *Journal of Dairy Science* 88: 4204-4213.

7. Alilou H., Hassani L. M. I., Barka N., Bencharki B., 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus.*, *Afrique Science* 10(3) 316 – 328.

8. Almas, K. and N.H. Al-Bagieh, 1999. The Antimicrobial effects of bark and pulp extracts of miswak, *Salvadora persica*. *Biomed Letters.*, 60: 71-75.

9. Almas, K., 2001. The Antimicrobial effects of seven different types of Asian chewing sticks. *Odonto-Stomatologie Tropicale.*, 96: 17-20.

B/

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

2. Bekhouche Farida. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.

3. Bergy's manual. (2009) . Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition Springer.

4. Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22, 1554–1558.

5. BONNIER Gaston - Sur quelques variations de la structure du *Thymus vulgaris*. - 1889 - *morphologie, structure, tige, variabilité, thymus vulgaris - page CCLXXIV-CCLXXVII*, p. 21-34 - Départ./Région : 32 – Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Compte rendus des séances, Tome 36 - Fascicule congrès - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°10104.

6. Bonnier G. et Douin R., *La grande Flore en Couleurs de Gaston Bonnier*, Éditions Belin, 1990, réédition de la Flore Complète Illustrée en Couleurs de France, Suisse et Belgique.

7. Bolivar P., Cruz-Parades C., Hernandez L. R., Juarez Z. N., Sanchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic

activities of of *Galium mexicanum*, Journal of Ethnopharmacology,137. 141– 147, published by Elsevier Ireland Ltd.

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

9. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p.

C/

1. Carine. D ; Tonart. P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.

2. Cameroun, Biotechnol., Agron. Soc. Environ. 13 (1) (2009) 77-84. 26. Roman P., Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), Ind. Crops . Prod. 30(2) (2009) 311–315.

3. CATIER O., ROUX D., 2007.- Botanique pharmacognosie phytothérapie. Édit.3. Wolters Kluwar. 141 p.

4. Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D. (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuw.* 70: 253-267 .

5. Chong, P., Drake, L., Biswas, I., 2008. Modulation of covR expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of Bacteriology* 190, 4478–4488.

6. Courtin, P., Monnet, V., and Rul, F. (2002) Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have adifferent role in *Streptococcus thermophilus/ Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology-Sgm* **148**: 3413-3421.

7. Crittenden, R.G., Martinez, N.R., and Playne, M.J. (2003) Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal ofFood Microbiology* **80**: 217-222.

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

9. Chaovanalikit, A. and R.E. Wrolstad, 2014. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J. Food Sci.*, **69**: 67-72.

D/

1. De Roissart H.B. (1986). Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.

2. De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.

3. Desmazeaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, **5**, pp: 331-343.

4. Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y., Rul, F., 2005. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8597–8605.

5. Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.Y., and Rul, F. (2005) Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8597- 8605.

6. Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , **13**: 143-154.

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

8. Dohou N., Tahrouch S., Hassani L. M. I., Badoc A., Gmira N., Yamni K.. 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelya lythroides.*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **142**, 61-78.

F/

1. Facklam, R. (2002) What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 613-+.

2. FAO, T. W. H. O. (2001) .Probiotic definition.

3. Fukushima, T., Szurmant, H., Kim, E.J., Perego, M., Hoch, J.A., 2008. A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **69**, 621–632.

4. Field et al., 2007. in construction of a new shuttle vector and its use for cloning AND expression of two plasmid encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BGSJ2-8. *Int.J.Food Microbiol.*

5. Filmond et al 2000, Richard et al 2006. In .Bacteriocins : mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: p 186.1999.

6. Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. 1986. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, **64** (2) : 159-164.

7. François T., Pierre M.J.D., Modeste L.S., Edwige N.M., Guy B.T.F., Paul H H.A.Z., Chantal M., Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun, *Biotechnol., Agron. Soc. Environ.* **13** (1) (2009) 77-84.

G

1. Gevers. D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

2. Golmakani M. T. et Rezaei K. 2008. Comparaison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food chemistry.*, **109** : 925-93.

H/

1. **Hans W. K.** 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

Herrero.

2. **Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., Maguin, E., 2008.** Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8, 4273–4286.

3. **Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E., Rul, F., 2009.** Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2062–2073.

4. **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 365S–73S.

5. **HECKEL Edouard** - Lettre à M. le Secrétaire général de la Société botanique de France. - 1908 *floristique, herborisation, thymus vulgaris, odeur, citronelle* , p. 515-516 - Départ./Région : 32 – Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Bull. Soc. Bot. Fr. (1904), Tome 55 - Fascicule 7 - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°13254.

J/

1. **Juillard, V., Desmazeaud, M.J., and Spinnler, H.E. (1988)** Demonstration of Urease Activity in *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 818-822.

2. **Jiménez-Arellanes A., Martínez R., García R., León-Díaz R., Aluna–Herrera J., Molina –Salinas G. et Said-Fernández S.** 2006. *Thymus vulgaris* as a potential source of antituberculosis compounds. *Pharmacologyonline.*, **3** : 569-574.

3. Jerez, M., M. Pinelo, J. Sineiro and M.J. Nunez, 2006. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: Assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chem.*, 94: 406-414.

K/

1.Klaenhammer., 1988 in les bacteriocines des bacteries lactiques ,caracteristiques et interets pour la conservation des produits alimentaires . BASE.VOLUME 13. 2009.

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

L/

1.Lambinon J. et al., *Nouvelle flore de la Belgique, du G.-D. de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes)*, Meise, Jardin botanique national de Belgique, 6^e éd., 2012, 1195 p.

2. Luhata P., Kanangila A. B., Kitawa E. K., Mulungulungu D., Lumbu J. B., Kalonda E., 2008. Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea.*, Université de Lubumbashi.

M/

1.Makhloufi .K. M. (2012) Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv).

2. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of

the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 15611–15616.

3. Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

4. Marmonier AA .Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques ,bactériologie médicale, technique usuelle 1990 ; 123 :227-226.

5. Mitrophanov, A.Y., Churchward, G., Borodovsky, M., 2007. Control of streptococcus pyogenes virulence: modeling of the CovR/S signal transduction system. Journal of Theoretical Biology 246, 113–128.

6. Monnet, C., Pernoud, S., Sepulchre, A., Fremaux, C., and Corrieu, G. (2004) Selection and properties of *Streptococcus thermophilus* mutants deficient in urease. *Journal of Dairy Science* **87**: 1634-1640.

7. Mora, D., Maguin, E., Masiero, M., Parini, C., Ricci, G., Manachini, P.L., and Daffonchio, D. (2004) Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 209-219.

8. Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci. Technol .*, **43**: 1320-1324.

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

10. Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S. 2005. Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

N/

1.Naguib N.Y.,Thyme (*Thymus vulgaris L.*) growth, oil quality, yield and chemical composition as affected by of chelated iron and two potassium forms., *Arab Univ. J. Agric. Sci.* 10 (3) (2002) 893-918.

2. Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

3. NEGRE R. - Un nouveau taxon de Thym dans le pays de Luchon *Thymus vulgaris L. var. prostrata nov. var.* - 1972 - *floristique, herborisation, thymus vulgaris, odeur, citronelle* , p. 3-4 - Départ./Région : 32 – Le Monde des Plantes, Le Monde des Plantes, Intermédiaire des botanistes, N°374 - Saisie : Centre Régional de Phytosociologie / Conservatoire Botanique National de Bailleul - Art. n°3102.

O/

1.Oppegard et al (2007). In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.

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

3. Olivier G. Epidémiologie bactérienne et résistances aux antibiotique 2007 ;48 :51-58

P/

1.Paterson, G.K., Blue, C.E., Mitchell, T.J., 2006. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology* 55, 355–363.

2. Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., and Guedon, G. (2004) Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICES_{t1}-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology-Sgm* **150**: 759-774.

3. Prescott et al (2003). microbiologie.2ème Edition française. Traduction de la 5ème Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck.

4. Pino J.A., Estarron M., Fuentes V. Essential oil of thyme (*Thymus vulgaris L.*) grown in Cuba., *J. Essent. Oil Res.* 9 (5) (1997) 609-610.

R/

1. Raynaud. S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309.

2. REYNIER Alfred - Motifs de rejet, pour la Systématique provençale, du *Thymus vulgaris L.* variété *citriodorus* Hackel. - 1916 - *taxinomie, thymus vulgaris, variabilité intraspécifique, citronnelle, nomenclature* , p. 196-204 - Départ./Région : 32 - Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Bull. Soc. Bot. Fr. (1904), Tome 63 - Fascicule 5-9 - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°14330.

3. Ross.P. R ; Morgan, S. et Hill, C. (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* 79: 3 – 16.

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

5. Ranarivelo Y., 2004. Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

6. Rizk A. M., 1982. Constituants of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, 52 (2), p 35-42

S/

1.Satura et Federighi (1998). In Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés.

2. Staron, A., Finkeisen, D.E., Mascher, T., 2011. Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55,515–525.

3. Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, p. 7-18. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.), the lactic acid bacteria, vol.2: The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

4. Stiles, M. and Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp: 1-29.

5. Sun, Z., Chen, X., Wang, J., Zhao, W., Shao, Y., Wu, L., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Meng, H., Zhang, H., and Chen, W. (2011) Complete Genome Sequence of *Streptococcus thermophilus* Strain ND03. *Journal of Bacteriology* **193**: 793-794.

6. Selmi S. et Sadok S. 2008. The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris Linnaeus*) on flesh quality of tuna (*Thunnus Linnaeus*) during chilled storage. *Pan-American Journal of aquatic sciences.*, **3** (1) : 36-45.

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

T/

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

2. Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet 59.

V/

1. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407.

2. V. G. De Billerbeck, "Huiles essentielles et bacteries resistantes aux antibiotiques," *Phytotherapie*, vol. 5, no. 5, pp. 249- 253, 2007.

W/

1.(http://www.institut-rosell-allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg) (<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg>).

2. **Wikipédia**. 2008. L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>.

Z/

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

L'objectif de cette partie d'étude est de préparer des milieux de culture dont les pouvoirs de détection des flores bactérienne pourraient augmenter la capacité de mettre en évidence les microorganismes qui ne s'adaptent pas ou s'adaptent avec les différent extrait de *Thymus vulgaris*.

Les milieux qu'on compte préparer sont des milieux spécifiques basés sur les éléments constituant les milieux MRS, M17, Mueller Hinton : Extrait de levure, Glucose extrait de Pomme de terre, gélose, peptone...etc.

Ces milieux peuvent être rendus plus sélectifs et le développement des bactéries peut être aussi inhibé par l'adjonction d'antibiotiques (pénicilline). (Guiraud, 2004)

➤ Méthodes de travail

1 –Préparation des milieux de culture

Il existe de nombreux milieux de culture qui permettre le développement, la conservation, l'isolement, la sélection des micro-organismes. Ces milieux peuvent être soit trouvés dans le commerce sous forme de milieu prêts a l'emploi, soit fabriqués en laboratoire.

Ils se divisent en milieux complexes de composition chimique mal définie et en milieu synthétiques de composition chimique définie. (Joseph Pierre Guirade, 1998) .

A. Préparation de milieu M.R.S (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

- Extrait de viande10g
- Extrait de levure 05g
- Acétate de sodium:05g inhibiteur
- Phosphate bipotassique02g
- Citrate d'ammonium02g
- sulfate de magnésium0.25g
- Sulfate de manganèse0.05g
- Glucose20g
- Tween 8001ml : agent sélectif
- Eau distillée1000 ml
- pH05



Figure 25. Milieu M.R.S.

B .Préparation de milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

- Extrait de viande05g
- Tryptone 2.5g
- Peptone papainique de soja2.5g
- Peptone pepsique de viande..... .05g
- Peptone de caseine..... 10g
- Acide ascorbique.....0.5g
- Lactose05g
- Glycérophosphate de sodium19g
- MgSO40.25g
- Agar-agar15g
- Eau distillée1000 ml
- pH7,1



Figure 26.Milieu M17.

C. Préparation d'Agar Mueller Hinton

L'agar Mueller Hinton conditionnée dans des 20 boîtes 90mm, avec stabilité de 60 jour .C'est un milieu nutritif conservé a 2-8C°.Utilisé pour tester la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides par des testes de d'effusion .La gélose Mueller Hinton est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard la composition de ce milieux est :

- Infusat de viande :.....02,0 g /l
- Hydrolysat de caséine :.....17,5 g /l
- Amidon :.....1,5 g /l
- Extrait de levure 01g/l
- Agar-Agar :.....13 g /l
- Eau :.....1000ml
- Ph :.....7,4



Figure 27. Agar Mueller Hinton.

D. Préparation bouillon de Mueller Hinton

Milieux Mueller Hinton et proposé en 1941 pour tester la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides elle se compose de :

- Infusat de viande :.....02, 0 g /l
- Hydrolysate de caséine :.....17,5 g /l
- Amidon :.....01, 5 g /l
- Extrait de levure01g/l
- Eau :.....1000ml
- Ph :.....7,4



Figure 28. Bouillon de Mueller Hinton.

E. Pénicilline G

✓ Définition

Antibiotique bêta-lactaminé de la famille des benzylpénicillines, la pénicilline G est utilisée dans le traitement de graves infections, en injection.

✓ Utilisation

Administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire, la pénicilline G est utilisée dans le traitement des infections plus graves que celles pouvant être soignées par voie orale : septicémies, gangrène gazeuse, infections dues aux germes sensibles, qu'il s'agisse de manifestations respiratoires, stomatiques, cutanées, rénales, gynécologiques, digestives ou méningées.

✓ Propriétés

Découverte en 1928 par Alexandre Fleming, la pénicilline G est un antibiotique bêta-lactaminé de la famille des pénicillines. Il s'agit d'une toxine synthétisée avec des moisissures du genre penicillium. La pénicilline G agit en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries, empêchant ainsi leur multiplication.

✓ Médicaments

Sous forme de poudre pour solution injectable, la pénicilline G est le composant de plusieurs médicaments : Benzathine Benzypénicilline Panpharma ® 1,2 MUI, Extencilline 1,2 MUI, 1,4 MUI et 600000 UI, Penicilline G Panpharma 5 MUI et 1 MUI.

✓ Précautions d'emploi

Si la pénicilline G peut être utilisée chez les adultes comme chez les enfants, toute réaction allergique caractérisée par de la fièvre, de l'urticaire ou encore une éosinophilie, impose l'arrêt du traitement. Cette substance est d'une manière générale contre-indiquée aux personnes souffrant d'allergie aux antibiotiques bêta-lactaminés - un interrogatoire est nécessaire avant tout traitement étant donné le risque de choc anaphylactique sévère. Elle passe dans le lait maternel et ne doit donc pas être utilisée en cas d'allaitement. Enfin, la posologie doit être adaptée pour les personnes souffrant d'insuffisance rénale.

✓ Effets secondaires

À fortes doses, la pénicilline G est susceptible de provoquer des encéphalopathies métaboliques avec mouvements anormaux, troubles de la conscience et/ou crises convulsives.



Figure 29.Penicillin G.

F. Préparation de bouillon nutritif

- Extrait de levure.....02 g/l
- Extrait de viande05 g/l
- Peptone pancréatique10 g/l
- Chlorure de sodium.....05 g/l
- Ph.....7,4



Figure 30. Bouillon nutritif.

G. Préparation de l'eau physiologique

✓ Définitions

L'eau physiologique à 0,90 % est un diluant isotonique utilisé pour les dilutions ou la réalisation de suspensions bactériennes.

✓ Composition :

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée
Chlorure de sodium : 09



Figure 31. L'eau physiologique.

Les appareils et matériels utilisés sont :

- Balance
- Bain- marie à 45C°
- Four pasteur
- Bec benzène
- Etuve .type à 37C°
- Broyeur
- Agitateur magnétique
- Agitateur-plaque chauffante
- pH mètre
- Tubes stériles
- Pipettes pasteur
- Boites pétrie
- Papier filtre Wattman N°3
- Anse à platine
- Pompe à vide
- Autoclave : un autoclave est un appareil qui produit une vapeur d'eau saturée à une température d'au moins 120 °C afin d'assurer la destruction complète des micro-organismes. C'est la stérilisation en chaleur humide à l'autoclave ou autoclavage.
- Spectrophotomètre UV-Visible