



DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

M^{me} Guemidi Chafika

M^{lle} Djerourou Nora

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité: CONTROLE DE LA QUALITE DES ALIMENTS.

THÈME

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

Soutenu publiquement le 22/Juin /2017.

DEVANT LE JURY

Encadreur	M. AIT SAADA.D.	M.C.B	Université de Mostaganem .
Président	M. SELSELET ATTOU.G	Professeur	Université de Mostaganem.
Examineur	M. BENMILOUD Djamel	M.C.B	Université de Mostaganem.
Examineur	M. BEKADA.A	Professeur	Université de Tissemsilt.
Examineur	M. LABDAOUI Djamel	M.C.B	Université de Mostaganem.
Invité	M. HAROUN	Doctorant	Université de Mostaganem.

Année universitaire : 2016 – 2017.

Le thème réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie et le laboratoire de chimie - Université de Mostaganem

Remerciements

Nos sincères remerciements et reconnaissance à **Monsieur AIT SAAD Djamel , Maître de conférences à l' Université de Mostaganem** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseils précieux .

Nos vifs remerciements à **M^r SELSELET ATTOU.G, Professeur à l'Université de Mostaganem** , pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

Nous tenons à remercier chaleureusement :

- **M^r BENMILOUD Djamel, Maître de conférences à l' Université de Mostaganem .**
- **M^r BEKKADA. A, Professeur à l'Université de Tissemsilt .**
- **M^r LABDAOUI Djamel , Maître de conférences à l' Université de Mostaganem.**
- **M^r HAROUN , Doctorant à l' Université de Mostaganem.**

De nous avoir honoré de leur présence et d'avoir accepter examiner ce travail.

SOMMAIRE

Introduction	1
--------------------	---

Partie1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I

Le Thymus vulgaris

1/ Généralités :	3
2/ Origine et distribution de la plante	3
3/ Place dans la systématique	3
4/ Description botanique de la plante	4
5/ Composition Chimique	5

Chapitre II

Les bactéries caractéristiques du yaourt

1/ Caractéristiques générales des bactéries spécifiques du yaourt	8
1-1/ Streptococcus thermophilus	8
1-2/ Lactobacillus bulgaricus	8
2/ Comportement associatif des deux souche	9

Chapitre III

Les huiles essentielles

1 / Généralité	10
2 / Origine et localisation des HES	10

3 / Procédés d'extraction des huiles essentielles	10
3- 1 /La distillation	11
3-1-1/ L'hydrodistillation	11
3-1-2/ La distillation à la vapeur :.....	13
3-2 / L'extraction par enfleurage	14
3- 3 / L'extraction par les solvants volatils	14
3- 4 / L'extraction par expression	15
3-5 / L'extraction par micro-ondes	16
3-6 / Extraction par ultrasons	17
3-7/Extraction au fluide supercritique	17
4/ LES HYDROLATS	18
4-1 / Considérations générales	18
4-2 / Composition	20
5/ Activité biologique des huiles essentielles	21
5-1/Activité antioxydante	21
5-2/ Activité antibactérienne	21

Partie 2 : Méthodologie expérimentale

1/ Objectif	24
2/ Matériel	24
2-1/ Matière végétale	24
2-2/ Souches microbiennes	24
2-3/ Milieux de culture	24
2-4/ Antibiotiques	25
2-5/ Solvant	25
3/ Méthodes expérimentales	25
3-1/ Extraction des composés bioactifs	25
3-2 / Etude de l'activité antimicrobienne	27
3-2-a /Activation des inocula microbiens	27
2-2-b Etude de l'effet antimicrobien	28
2-2-b-1 /Méthode de contact direct	28
2-2-b-2 / Méthode des disques par diffusion sur gélose	29
3-2-b-3 /Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	31
3-2-b-4 / Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	32
2-2-b-5 / Traitement statistique	33

Résultats et discussion

1/ Résultat	34
1- 1 / <i>Streptococcus Thermophilus</i>	34
1-1-1/ Méthode de contact direct (Croissance microbienne)	34
1-1-2/ Diamètres d'inhibitions (Méthodes des disques).....	36
1-1-3/ Taux d'inhibitions (Méthodes des disques).....	38
1-1-4/ Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	39
1-1-5 / Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	40
1--2/ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	41
1-2-1/ Méthode de contact direct (Croissance microbienne)	41
1-2-2/ Diamètres d'inhibitions (Méthodes des disques)	43
1-2-3- Taux d'inhibition (Méthodes des disques)	44
1-2-3/ Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	45
1-2-4/ Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	46
2/ Discussion des résultats	48
Conclusion	51

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	4
Tableau 2 : Teneur en polyphénols dans l'infusion aqueuse du <i>Thymus</i>	6
Tableau 3 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i>	7
Tableau 4: Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	34
Tableau 5 : Effet des différentes dilutions d'extrait à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des diamètres d'inhibition chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	36
Tableau 6 : Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de <i>Thymus Vulgaris</i> sur les variances de taux d'inhibition chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	38
Tableau 7 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	39
Tableau 8 : Effet inhibiteur de l'extrait des composants bioactifs de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	41
Tableau 9 : effet des différentes dilutions d'extrait à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (n= 3)	42
Tableau 10 : effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances des diamètres d'inhibition chez <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	43
Tableau 11 : effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur les variances de taux d'inhibition chez <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	45
Tableau 12 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait des de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	46
Tableau 13 : Effet inhibitrice de l'extrait des composants bioactif de thymus vulgaris sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	47

Liste des figures

Fig. 1 : Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris</i> L.	5
Fig.2 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	12
Fig. 3: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes	17
Fig.4: Extraction des composés bioactifs du <i>Thymus vulgaris</i> selon le protocole de Sultana et al ; 2009	26
Fig .5 : Evaporation sous vide à 45c° (Rotavapeur BÜCHI)	26
Fig .6: Activation des souches bactériennes étudiées	27
Fig.7 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne	30
Fig. 8 : Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	31
Fig. 9 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait à différentes concentrations et de l'antibiotique sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	37
Fig.10 : Détermination de la CMB de l'extrait des composants bioactif de thymus vulgaris sur la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i>	40
Fig.11 : Effet des différentes dilutions d'extraits a l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	42
Fig.12 : Diamètre d'inhibition de l'extrait des différentes concentrations et l'antibiotique sur la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	49
Fig.14:Diamètres d'inhibition des solutions d'extrait de thym chez <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	44
Fig. 13 : CMB de l'extrait à l'éthanol de Thym chez <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	47

Liste des abréviations

CMB :Détermination de la concentration minimale bactéricide

CMI : Détermination de la concentration minimale inhibitrice

DO : Densité optique.

EtOH :Ethanol

Hes : Huiles essentiels

PAM : Plantes aromatiques médicinal

UFC : Unité formant colonie

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement les plantes aromatiques et les huiles essentielles possèdent un atout considérable, et sont largement utilisées en médecine et dans d'autres domaines d'intérêt économique tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire.

Le recours à l'utilisation des PAM est due à diverses raisons ,comme par exemple :

- ✓ l'existence de maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace ;
- ✓ l'activité antimicrobienne des plantes aromatiques ayant des vertus thérapeutiques démontrées ;
- ✓ le coût relativement faible des plantes médicinales par rapport aux médicaments conventionnels ;
- ✓ la disponibilité de ces plantes ;
- ✓ et l'envie de consommer « bio » et ces effets bénéfiques sur la santé.

En outre, l'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatiques médicinales, dont le Thym de la famille des Lamiacées ,qui est très répandus dans notre pays ,largement utilisé comme épice dans le domaine culinaire , reconnu par ces vertus thérapeutiques, et pouvant être utilisé en industrie agroalimentaire comme adjuvant dans certains aliments tels que les produits laitiers dont les yaourts par exemple.

De ce fait, nous nous sommes intéressé à connaître l'effet de l'utilisation de l'extraits du *Thymus vulgaris* sur la croissance des ferments lactiques spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* qui présentent des intérêts variés (industriels et nutritionnels) .

L'objectif de notre travail vise en particulier à étudier l'effet antibactérien des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* extraits de la plante par usage d'un solvant polaire (l'éthanol) sur les deux germes *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* spécifiques du yaourt .

Plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été utilisées lors de cette étude :

1- Procéder à une extraction à l'Éthanol des principaux composés bioactifs de la plante .

2- Suivre les effets antimicrobiens de l'extrait de *Thymus vulgaris* sur les germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* cultivés in vitro, par la méthode de contact direct sur milieu solide.

3- Evaluation de l'activité inhibitrice de l'extrait de la plante effectuée en comparaison à un ATB (la pénicilline).

4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

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

1/ Généralités :

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

Le nom *Thymus* dérive du mot grec « thymos » qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (**Pariente, 2001**).

2/ Origine et distribution de la plante :

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

Le *Thymus vulgaris* se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (**Kaloustian et al., 2003**). Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (**Poletti, 1988**).

3/ Place dans la systématique :

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (**Morales, 2002**) synthétisée dans le Tableau 1.

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

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

4/ Description botanique de la plante :

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

Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent

l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont 2 regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999 ; Morales, 2002) (Figure 1).

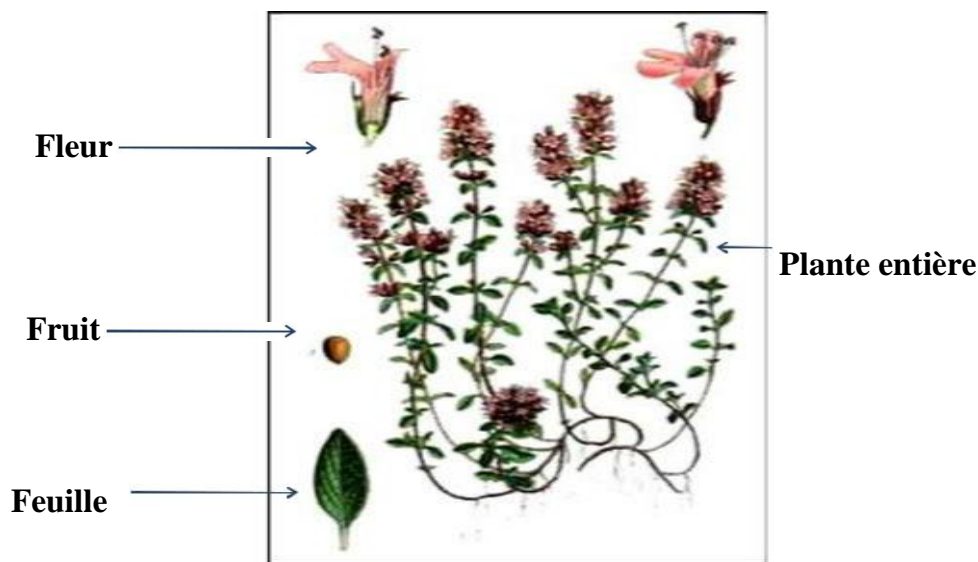


Fig. 1 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L.

(Iserin, 2001)

5/ Composition Chimique :

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

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à

une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymène (9,1 - 18,5 %), -terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée en thymol (**Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006**).

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

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

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

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

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

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

Tableau 3 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L.

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

1/ Caractéristiques générales des bactéries spécifiques du yaourt :

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

1-1/ *Streptococcus thermophilus* :

Streptococcus thermophilus est une cocci Gram positif, anaérobie facultative, non mobile. Elle est retrouvée dans les laits fermentés et les fromages (**Dellaglio et al,1994 ; Roussel et al,1994**). Elle se distingue essentiellement des autres streptocoques lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43°C .C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques . Elle est aussi résistante au chauffage à 60°C (parfois 65°C) pendant 30 minute (**Garvie ,1986 ;Dellaglio et al .,1994**).

Elle est caractérisée par une activité homo fermentaire, le plus souvent réduit à quelques sucre (glucose, lactose saccharose) et une forte sensibilité au NaCl (**Hardie ,1986**). Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposées en chaînes de longueurs variables ou par paires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50 °C. Son métabolisme est du type homo fermentaire (**Lamoureux, 2002**). Le rôle principale de *Streptococcus thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique et en plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés. Elle augmente la viscosité du lait par production de exopolysaccharides (composés de galactose ,glucose , ainsi que de petites quantités de rhamnose ,arabinose et de mannose) (**Bergamaier,2002**) .

1-2/ *Lactobacillus bulgaricus* :

Lactobacillus bulgaricus, est un bacille Gram positif, immobile, asporulé , microaérophile , il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chainettes , il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principale produit final à partir des hexoses de sucre par voie d'embden Meyerhof , il est incapable de fermenter les pentoses .

Lactobacillus bulgaricus est une bactérie thermophile , très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est environ de 42°C , cette bactérie à un rôle essentiel dans le développement des qualités organoléptiques et hygiéniques du yaourt (**Mary,Teyssset , et al. , 2002**).

Elle produit de l'acide lactique à partir du lactose, ce qui explique en partie pourquoi certaines personnes modérément intolérantes au lactose soient capables de consommer du yaourt sans inconforts digestifs. L'acide lactique donne également une saveur acide caractéristique au yaourt. L'acidité produite fait également coaguler la caséine, ce qui donne la texture au yaourt.(**Anonyme,2017**).

2/ Comportement associatif des deux souches :

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus* se développent en association (appelée protocoopération), dans des cultures mixtes ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel. Cette protocoopération se traduit d'abord par une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures (**LARPENT J.P. 1989**)

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

1 / Généralité :

L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe obtenu des plantes aromatiques. D'après l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, Edition 2000**), les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

L'odeur et la volatilité des essences contribuent dans les interactions entre les végétaux également entre le végétal et l'animal ou elles constituent un moyen de défense avec son action répulsive contre les prédateurs (micro-organismes, champignons, bactéries, animaux herbivores). Elles peuvent également participée à l'attraction des insectes pollinisateurs.

2 / Origine et localisation des HEs :

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite(sous forme de glucides, NADPH et d'ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires parmi elles les huiles essentielles (**Narishetty et Panchagnula, 2004**).

Les essences sont synthétisées par les végétaux supérieurs, il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles dont les Lamiaceae, les Asteraceae, les Rutaceae et les Lauraceae. Ces espèces sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et de stockage des huiles essentielles : les poches (Myrtacées, Rutacées) ou les canaux sécréteurs, les poils sécréteurs (Lamiaceae) et les cellules sécrétrices (Zingiberaceae, Lauraceae) (**Bruneton, 1993**). L'accumulation des HEs peut être dans toutes les parties de la plante : sommités fleuries (lavande), écorces(cannelier), rhizomes (Gingembre), fruits (Anis)...*etc.*

3 / Procédés d'extraction des huiles essentielles :

De tous temps, on connaît les vertus des «essences de plante» et on s'efforça de les

extraire depuis la plus haute antiquité. C'est vers le 13^{ème} siècle, en Europe, plus précisément dans le Sud de la France, au royaume des parfums, que l'on a commencé à explorer diverses méthodes d'extraction de ces huiles volatiles (**France-Ida, 1996**). Connaissant mieux les constituants des huiles, des techniques se sont développées visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant. La distillation est de loin, le procédé le plus utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

3- 1 /La distillation :

Selon **Benjlali (2004)** la distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation). La distillation peut s'effectuer avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau.

Bruneton (1999) signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal (**Anes et al., 1968 , Benjlali, 2004**) .

3-1-1/ L'hydrodistillation :

Distillation à l'eau ou « hydrodistillation » (**Fig.2**) dont le matériel végétal est en

contact direct avec l'eau. Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation.

Selon **Bruneton(1999)**, l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle , La non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation (**Chalchat et al., 1997**).

Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. Parmi les huiles extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron .

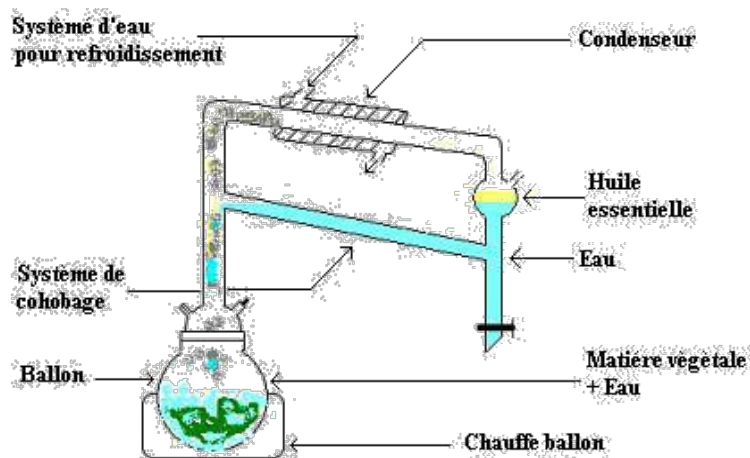


Fig.2 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez Ochoa, 2005)

3-1-2/ La distillation à la vapeur :

Distillation à la vapeur saturée : «vapo-hydrodistillation» : c'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques (**Bego, 2001**). Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (**Anes et al., 1968 , Benjilali, 2004; Belaiche, 1979**).

Cette méthode est utilisée dans la distillation à partir de plantes fraîches telles que la menthe et le myrte et les plantes qui portent leurs huiles essentielles dans les feuilles qui sont cueillies puis partiellement coupées ensuite portées au dispositif de distillation. Puisque

la plante fraîche est riche en eau, donc il n'est pas nécessaire de l'immerger (**Haeckel et Omar, 1993**).

Distillation à la vapeur directe : c'est une variante de l'entraînement à la vapeur qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur, la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (**Anes et al., 1968 ; Benjilali, 2004; Bruneton, 1999**). Il découle des recherches de (**Fathy et al.1965 ; Rudolf ,1968 ; de Vernon et Richard ,1976**) que l'entraînement à la vapeur d'eau est préférable à l'hydrodistillation du fait qu'elle

permet une extraction totale des huiles essentielles en améliorant le rendement de 33% par rapport à l'hydrodistillation.

3-2 / L'extraction par enfleurage :

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) , à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaiche, 1979 ; France Ida, 1996**). Pour certaines plantes, on procède à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou «digestion» (**Bruneton, 1999**).

Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys (**France-Ida, 1996**). Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite (**Abou Zeid, 1988**).

3- 3 / L'extraction par les solvants volatils :

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles.

Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète» (**Belaiche, 1979 ; Duraffourd et al., 1990**). Le choix du solvant

est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants), stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts, sécurité de manipulation c'est à dire non toxique ou inflammable. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol. Après l'extraction, le solvant est distillé et en fin de l'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci (**Bruneton, 1999**).

L'extraction par les solvants présente toutefois des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits : de nombreuses substances peuvent de ce fait se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, certaines coumarines) et imposer une purification ultérieure, et en second lieu, à la toxicité des solvants et leur présence sous forme de traces résiduelles dans l'extrait final (**Bruneton, 1999**). En effet, **Viaud (1993)** affirme que des analyses sérieuses, par les méthodes les plus modernes, montrent que les proportions de solvants résiduels dans les concrètes se situent entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles huiles ne sont donc pas admissibles à l'usage médical par contre, elles sont admissibles en parfumerie.

3- 4 / L'extraction par expression :

L'essence, altérable par entraînement à la vapeur d'eau, est ici extraite du péricarpe frais d'agrumes par différents modes d'extractions : dans l'industrie, les

zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (**Bruneton, 1999**) ; ou encore après scarifications mécaniques, un entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment (**Paris et Hurabielle, 1981**). Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (**Belaiche, 1979**).

3-5 / L'extraction par micro-ondes :

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**Paré, 1997**). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**France Ida, 1996**). Ce procédé (**Figure 3**), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (**Bruneton, 1999**). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon **Scheffer (1996)** que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative.

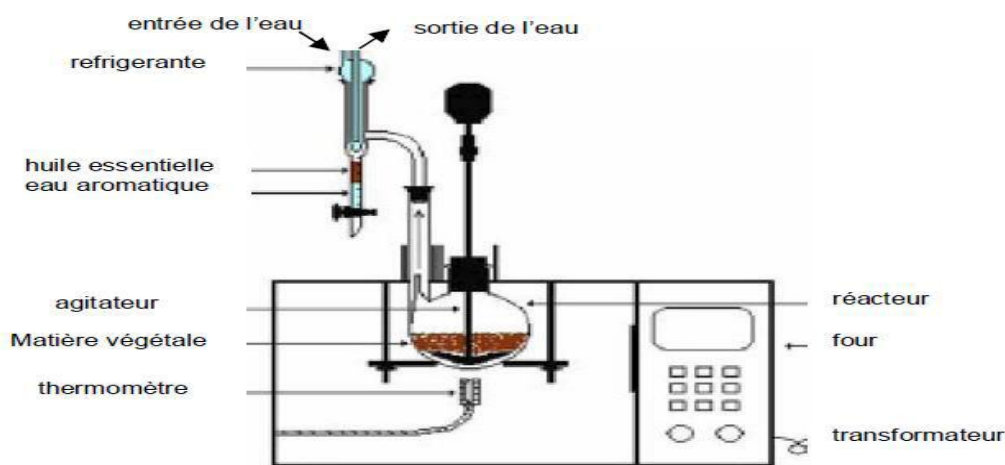


Fig. 3: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes (Lagunez-Rivera, 2006)

3-6 / Extraction par ultrasons :

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles (Lagunez-Rivera, 2006).

3-7/ Extraction au fluide supercritique :

Procédé relativement nouveau semblait à priori intéressant pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. En effet, dans des conditions particulières de température et de pression situées au-delà du point critique, les fluides à l'état supercritique acquièrent des propriétés importantes qui se caractérisent par une bonne diffusibilité dans les matières solides

et un bon pouvoir solvant. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, mais l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO₂ car, celui-ci présente d'incontestables atouts : produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (**Bruneton, 1999 ; Wichtl et Anton, 1999**).

L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au delà de son point critique (P =72.8 bars et T= 31.1°C). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et le charge en composé à extraire ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait. L'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit selon **Scheffer (1996)** des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques.

Bruneton (1999) précise aussi que cette méthode est utilisée maintenant pour préparer des extraits d'épices (gingembre, paprika, céleri), des arômes (thé noir, bois de chêne fumé) et des essences végétales pures (débarrassées des terpènes, dépourvues d'intérêts olfactifs et oxydables, ou privées de certains constituants) et que les produits obtenus par cette technique ont une composition proche de celle des produits naturels et ne comportent aucune trace résiduelle de solvant, contrairement à ce que l'on peut obtenir avec des solvants ordinaires.

4 / LES HYDROLATS

4-1 / Considérations générales

Lors de certains processus d'extraction des huiles essentielles, un sous-produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat ou *hydrosol* en anglais. Dans le cas de la distillation, la vapeur d'eau

traverse la matière végétale puis se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant. L'eau se dissocie alors spontanément de l'huile essentielle du fait de leur non miscibilité tout en conservant une petite portion des composés volatils de l'huile essentielle (**Price et al,2004**), Malgré cette faible concentration en principes actifs, les hydrolats présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes .

Certains hydrolats sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires: les hydrolats de rose, de fleur d'oranger, de lavande et de fleurs de bleuets sauvages en sont des exemples. Certaines plantes sont distillées uniquement pour leur hydrolat comme par exemple *Hamamelis virginiano* L. dont le distillât de feuilles et de rameaux floraux est un composant fréquent de produits dermatologiques grâce à ses propriétés désinfectantes et astringentes (**Bremness, 1996**). Le principal marché des hydrolats se situe dans le domaine des cosmétiques et des arômes alimentaires. Cependant, avec le regain d'intérêt actuel pour les médecines alternatives telle que l'aromathérapie, les hydrolats sont aujourd'hui de plus en plus utilisés pour leurs vertus thérapeutiques (**Catty, 2001**). Malgré cet engouement, les chercheurs ne s'y intéressent que très peu. Il existe donc un réel manque de données scientifiques dans ce domaine. Pourtant, la faible toxicité et la nature chimique des hydrolats en font un produit original, intéressant à étudier comme en témoignent les rares publications parues à leur sujet. Les études pharmacologiques réalisées présentent en effet des résultats très prometteurs.

Dans la littérature scientifique anglophone, les hydrolats sont trouvés sous différentes appellations: *hydrosoi, floralwater, aqueous distillate, aromatic water*, etc. La plupart de ces termes prêtent à confusion puisque beaucoup sont employés d'une manière incorrecte. Le terme *hydrosol* est le plus communément utilisé mais ce mot est inapproprié puisqu'il s'agit d'un terme générique employé pour désigner,

en chimie physique, une solution colloïdale dans l'eau. Un *hydrosol* est obtenu par macération prolongée de l'huile essentielle dans de l'eau pure alors que l'hydrolat est obtenu par un procédé d'hydrodistillation. Le terme *floral water* ou eau florale est également inadéquat puisqu'il désigne uniquement les infusions obtenues par macération de fleurs dans l'eau. Pour mettre fin à cette confusion, les anglophones utilisent de plus en plus le terme français « hydrolat » (**Price et al., 2004**).

4-2 / Composition

Les hydrolats contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile. La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles: les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpeniques sont la plupart du temps quasi absents. Certains hydrolats présentent une plus grande proportion de molécules lipophiles comme ceux de *Mentha piperita* ou *Melissa officinalis* (**Price et al., 2005**). Pour pouvoir effectuer l'analyse de la composition chimique des hydrolats par GC-MS, il est nécessaire de « concentrer » l'hydrolat avant l'injection, en procédant à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que le chloroforme. À titre d'exemple, on a constaté des différences entre la composition de l'huile essentielle et celle de l'hydrolat d'*Origanum compactum* (**Jeannot et al., 2003**). Au total, 29 composés ont été détectés et identifiés dans l'huile essentielle et seulement huit dans l'hydrolat. Ces huit composés sont également présents dans l'huile essentielle: il n'y a donc pas, dans ce cas, de composés spécifiques à l'hydrolat. Ces molécules appartiennent à la famille des alcools, cétones et phénols. Aucun mono ou sesquiterpène n'a été détecté mise à part quelques traces de pinène. Les deux produits majoritaires sont le thymol et le carvacrol (>95%). Comparativement au carvacrol, le thymol se retrouve en plus faible proportion dans l'hydrolat car celui-ci est moins soluble dans l'eau que le carvacrol.

5/ Activité biologique des huiles essentielles :

5-1 / Activité antioxydante :

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif **(Beirão & Bernardo-Gil, 2006)**.

On distingue trois types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques. Les substances naturelles dont les huiles essentielles sont classées entant qu'antioxydants non enzymatiques.

L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène **(Madhavi et al., 1996)**.

Par contre, les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger , empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs **(Kohen et Nyska, 2002)**.

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques **(Hussain et al., 2010)**. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique **(Hussain, 2009)**.

5-2/ Activité antibactérienne :

L'une des premières mises en évidences *in vitro* de l'activité antibactérienne des HE date de la fin du XIX^{ème} siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de l'huile de thym en 1875.

Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Cox et al, 2000**). Dès lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Néanmoins, le mécanisme d'action des HE sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt, 2004**).

La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Guinoiseau, 2010**).

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**Guinoiseau, 2010**).

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Tsuchiya et al., 1996**). Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de L'ATP, et du phosphate inorganique (**Tsuchiya et al., 1996 ; Hammer et al., 1999 ; Daroui-Mokaddem, 2011**).

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et

parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire **(Baudoux, 2000)**.

Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles **(Hili et al., 1997 ; Billing et Sherman, 1998)**.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs.

En effet, l'activité antimicrobienne remarquable de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est en relation avec sa teneur élevée en thymol (un composé phénolique) qui est réputé avoir une très grande action antimicrobienne **(Ettayebi et al., 2000 ; Ultee et al., 2000 ; Friedman et al., 2002 ; Chun et al., 2005)**.

1/ Objectif :

Notre travail vise en particulier à étudier l'effet antibactérien des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* extraits de la plante par usage d'un solvant polaire (l'éthanol) sur les deux germes *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* spécifiques du yaourt .

2/ Matériel :

2-1/ Matière végétale :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *Thymus vulgaris* ; prélevé le moi de Mars 2017 , dans la Wilaya de Naama au sud d'Algérie . Un échantillon de 2 à 3 kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce étudiée a été récoltée de manière aléatoire dans la région de Mechria relevant de la Wilaya de Naama située à l'ouest d'Algérie (altitude : 35.51011 ; Longitude : 0.80343) .

La matière végétale a été ensuite étalée sur du papier aluminium ; puis séché à l'air ambiant durant 2 semaines. Les échantillons séchés sont en fin broyées 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.

2-2/ Les souches microbiennes :

Pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits *Thymus vulgaris* sur les bactéries du yaourt , les tests ont été portés sur deux souches pures de références et spécifiques du yaourt , à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* , lyophilisées et conservées au froid à 4 °C .

2-3/ Milieux de culture :

Suivant les méthodes employées et selon les souches en question, nous avons utilisé des milieux de culture suivants : la gélose Mueller Hinton (MH) ,le bouillon

Mueller Hinton (MH) , le bouillons nutritif , la gélose MRS ,la gélose M17 et la gélose (annexe I).

2-4/ Antibiotiques :

Afin déterminer la concentration minimale inhibitrice(CMB), notamment pour comparer les zones d'inhibition on a utilisé un antibiotiques de référence dont la pénicilline G.

2-5/ Solvant :

L'extraction des composés bioactifs de la plante mise à l'étude, est effectuée en utilisant l'éthanol comme solvant.

3/ Méthodes expérimentales :

3-1/ Extraction des composés bioactifs :

L'extraction des principaux composés bioactifs tels les polyphénols contenus dans le *Thymus vulgaris* est effectuée par la méthode décrite par (Sultana et al., 2009) en utilisant un solvant polaire d'épuisement des composés bioactifs du matériel végétal à savoir l'éthanol (EtOH) . 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.

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons ,dans notre cas, 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau v / v) pour pour chaque prise de 10g de matière végétale. L'extraction est effectuée sous agitation continue et à température ambiante durant 6 heures. Après filtration sur papier filtre Whatman (ayant une porosité de 0,2µm), le résidu est ensuite concentré et débarrassés du solvant par évaporation rotative sous vide à 45°C dans un rotavapeur (BÜCHI) (figure 6).

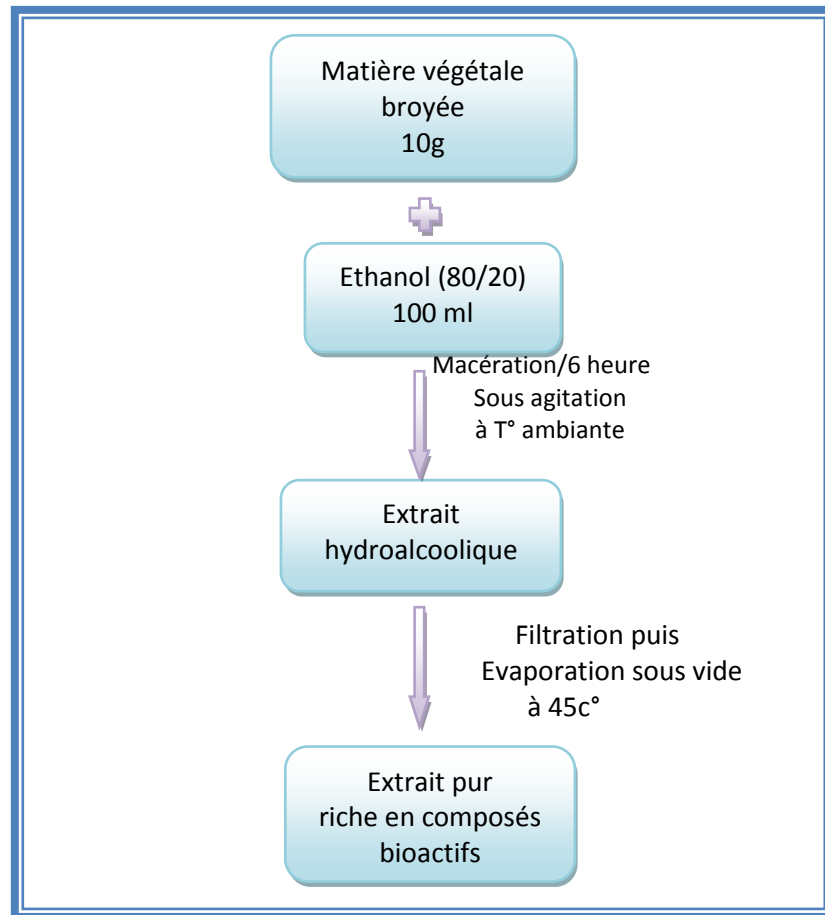


Figure 5: Etapes d'extraction des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* selon le protocole de(Sultana et al ; 2009)

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

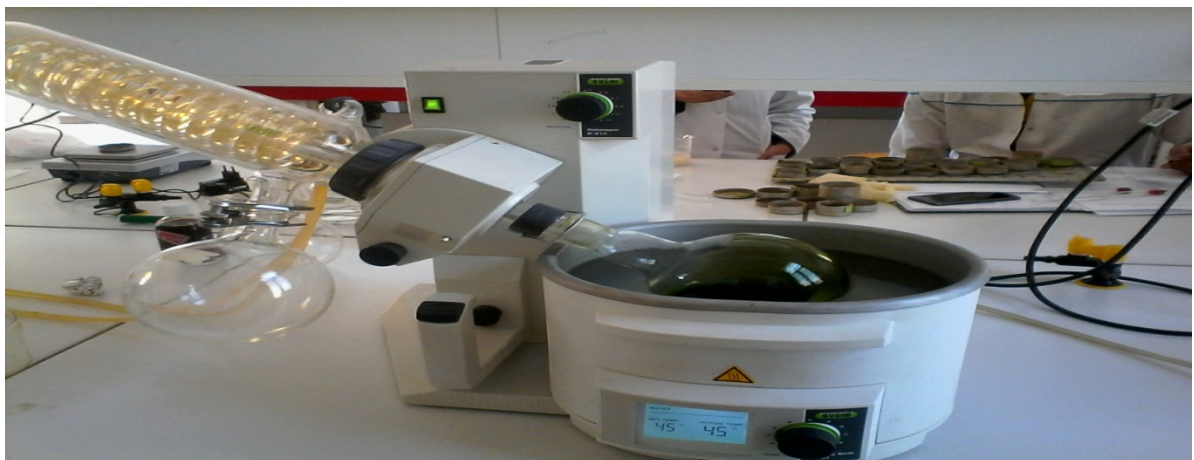


Figure 6 : Evaporation sous vide à 45°C (Rotavapeur BÜCHI)

3-2/ Etude de l'activité antimicrobienne

3-2-a / Activation des inocula microbiens :

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 est pris pour êtreensemencée en surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu spécifique gélosé de croissance pour chaque espèce microbienne (M17 pour *Streptococcus thermophilus* et MRS pour *Lactobacillus bulgaricus* , et le milieu TDYM pour le deux souches) puis le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures.

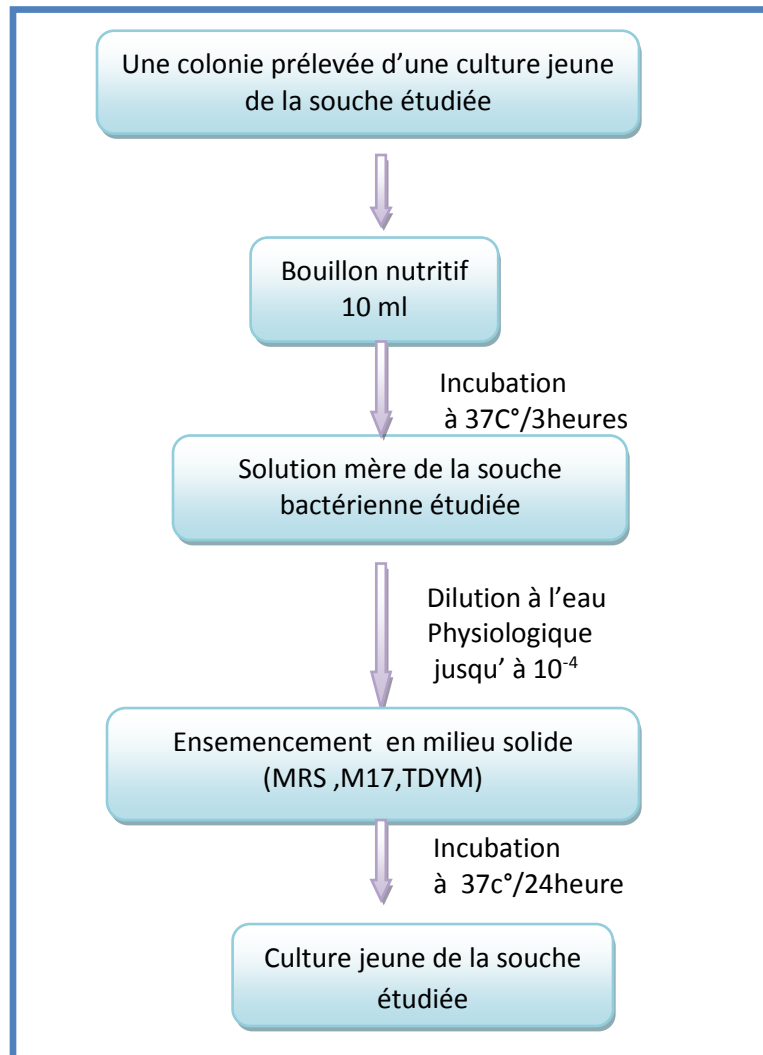


Figure 7: Etapes de l'activation des souches bactériennes étudiées

3-2-b /Etude de l'effet antimicrobien :

Quatre méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien de l'extrait brut des feuilles de *Thymus vulgaris*:

- 1- Méthode de contact direct (**Bourgeois et Leveau, 1980**) ,
- 2- Méthode des disques par diffusion sur gélose (**Prescott et al., 2003**) qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'extrait
- 3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Moroh et al., 2008**) .
- 4- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) (**Moroh et al., 2008**) .

3-2-b-1 /Méthode de contact direct :

Une colonie issue d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée sur milieu solide gélosé spécifique est prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, chacune sera ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03heures.

A partir de ces dernières solutions dont chacune constitue une solution mère d'une espèce de bactérie lactique donnée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique sont effectuées ; allant à 10^{-4} pour respectivement les *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus bulgaricus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale sont ensuite individuellement ajoutés à 09 ml de chaque extrait de thym dilué à l'eau distillée, respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%.

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

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

3-2-b-2 / Méthode des disques par diffusion sur gélose :

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'extrait (aromatogramme).

Les disques sont confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques sont stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

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

L'ensemencement des boîtes de Pétri contenant le milieu MRS ou M17 selon l'espèce microbienne « *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus bulgaricus* » est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution. Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre , préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemencée après imbibition pendant 5 minutes dans l'extrait obtenu , ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Pénicilline, seront 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 se fera après incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures à l'aide d'un pied à colis (**Guignar, 1998**).

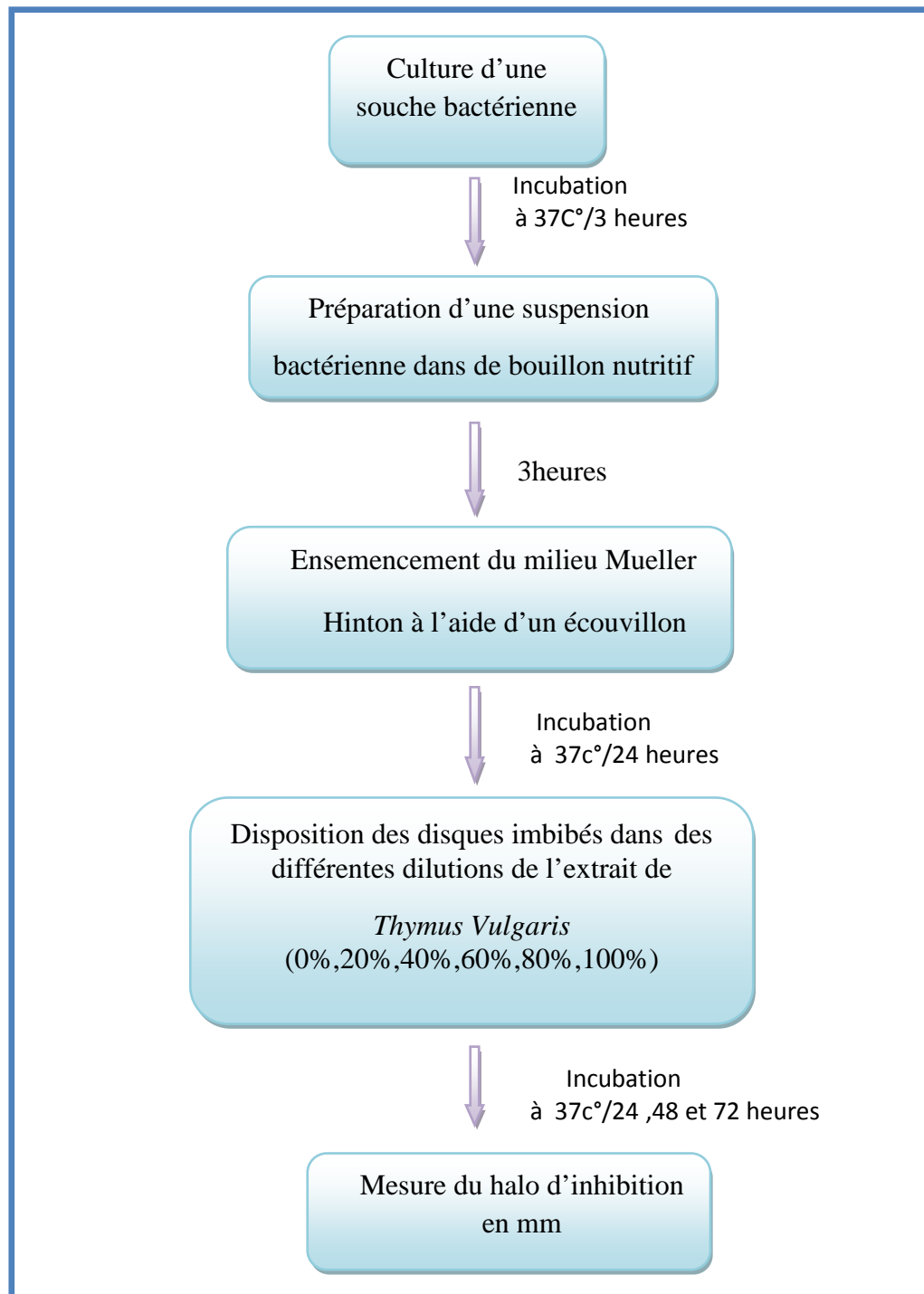


Figure 8 : Méthode des disques par diffusion sur gélose.

3-2-b-3 /Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

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

La méthode utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des espèces de germes spécifiques du yaourt (*Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus bulgaricus*) est celle de **Moroh et al, 2008**. Une colonie jeune de *Streptococcus thermophilus* ou de *Lactobacillus bulgaricus* prélevée à l'aide d'une anse à platine estensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis 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 de *Thymus vulgaris* dilué au bouillon Mueller Hinton.

Les tubes contenant séparément chaque extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie lactique seront ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié.

La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i 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 :

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

-S : Taux de survie du microorganisme en %.

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

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

3-2-b-4 / Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

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

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

3-2-b-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- 1/ *Streptococcus Thermophilus* :

1-1-1/ Méthode de contact direct (Croissance microbienne)

Les résultats de l'effet d'extrait à éthanol de *Thymus vulgaris* sur la bactéries *Streptococcus thermophilus* sont représentés dans la (**figure 9**) et rassemblés dans le (**Tableau 4**).

Le taux de croissance le plus élevé (103.10^5) est enregistré pour une solution d'extrait de thym préparé à 20% ($P < 0.01$).

Néanmoins, ce taux est plus faible ($p < 0.01$) par rapport à celui enregistré pour le témoin (140.10^5) préparé à base d'eau distillée stérile (sans extrait de thym) et continu à diminuer avec l'augmentation de la concentration, pour s'annuler à partir d'une concentration de 80% de l'extrait. L'extrait de thym a exercé à une concentration de 80% un effet bactéricide sur le germe étudié. Cela est confirmé par l'analyse de variance avec l'effet inhibiteur hautement significatif qu'elle a révélé.

Tableau 4. Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* (n= 3)

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Nombre de colonies (UFC/ml)	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	$140 \cdot 10^5$	a				** ($p \hat{=} 0,01$)
20%	$103 \cdot 10^5$		b			
40%	$81,67 \cdot 10^5$			c		
60%	$46,67 \cdot 10^5$				d	
80%	0				e	
100%	0				e	

Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d,e : comparaison des valeurs moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls .

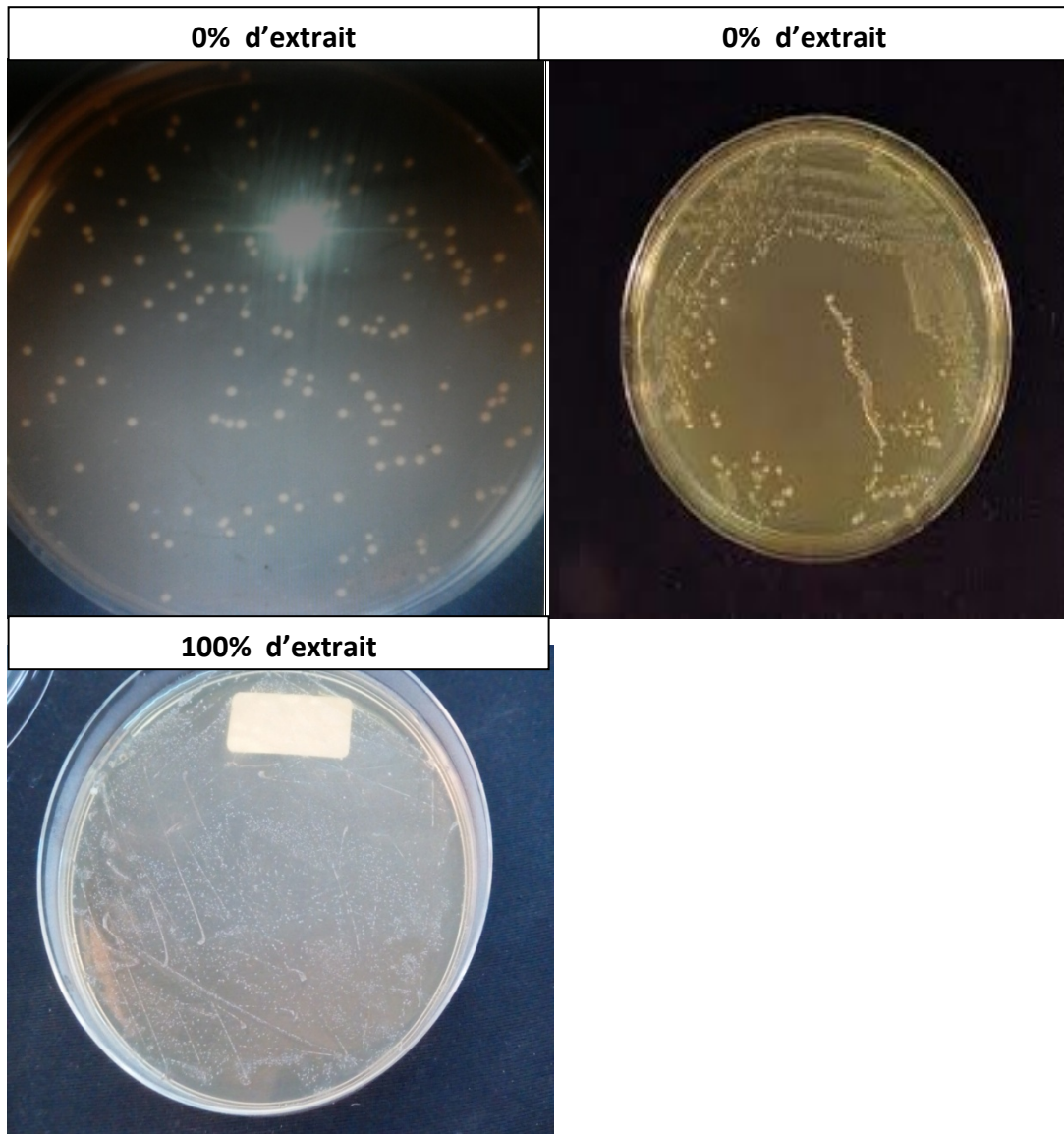


Figure 9 : Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* .

1-1-2/ Diamètres d'inhibitions (Méthodes des disques)

De larges écarts ($p \leq 0,01$) dans les diamètres de zones d'inhibition ont été obtenus, allant de 6,333 mm en présence d'extrait de thym à 20% et 40% ,et continue à augmenter jusqu'à 10 mm pour une concentration de 100% , sans atteindre celle enregistrée par la pénicilline (13,667). Tandis que pour le témoin , aucune zone d'inhibition n'a été détectée.(**Tableau 5** et **Figure 10**).

Tableau 5 .Effet des différentes dilutions d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez *Streptococcus thermophilus*(n= 3) .

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	0	0				d	** ($p \leq 0,01$)
20%	6.333	0.577			c		
40%	6.333	0.577			c		
60%	7.333	0.577			c		
80%	7.667	0.577			c		
100%	10	1		b			
Pénicilline	13.667	1.528	a				

Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d,e : comparaison des valeurs moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls .

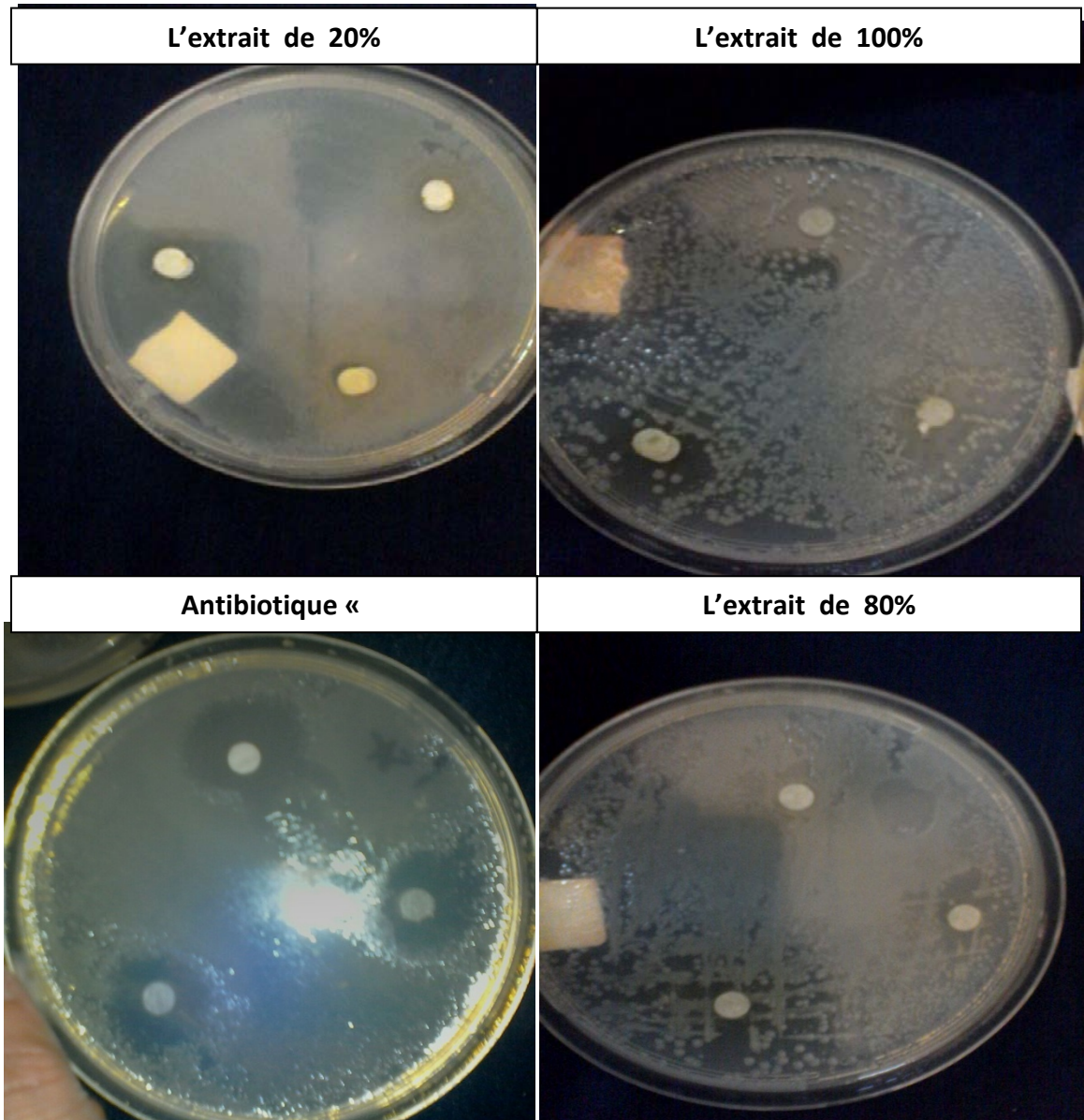


Figure 10 . Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait à différentes concentrations et de l'antibiotique chez *Streptococcus thermophilus* .

1-1-3/ Taux d'inhibitions (Méthodes des disques)

Le meilleur taux d'inhibition de *Streptococcus thermophilus* est réalisé avec la pénicilline qui s'est démarquée nettement des solutions d'extrait éthanolique de *Thymus vulgaris*.

L'extrait pur de thym a exercé un taux d'inhibition intéressant sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* ; d'environ 73.17 % . Ce taux reste toute fois inférieur ($p \hat{=} 0.01$) à celui de la pénicilline accusé un taux d'inhibition de 100%. Par ailleurs , les solution préparées à 20 , 40 ,60 et 80 % d'extrait éthanolique de thym marquant le même effet inhibiteur ($p \hat{=} 0.01$) chez l'espèce microbienne étudiée ; avec des taux d'inhibition variable de 46.34 à 56.10 en moyenne.

La solution témoin, sans extrait de *Thymus vulgaris* n'a induit aucune inhibition du germe objet de l'étude (**Tableau.6**)

Tableau 6 : Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de *Thymus Vulgaris* sur les variances de taux d'inhibition chez *Streptococcus thermophilus* (n= 3) .

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Taux d'inhibition (%)	Ecart type	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	0	0				d	** ($p \hat{=} 0,01$)
20%	46.34	4.225				c	
40%	46.34	4.225				c	
60%	53.66	4.225				c	
80%	56.10	4.225				c	
100%	73.17	7.317		b			
Pénicilline	100	0	a				

Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d,e : comparaison des valeurs moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls .

1-1-4/ Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

L'ensemble des concentrations minimales inhibitrices obtenues sont représentées dans le (**Tableau 7**).

Ainsi ; les concentrations de l'extrait du *Thymus vulgaris* de 20% et 40% laissent un seuil de survie des *Streptococcus thermophilus* de 55.34% et 32.14% respectivement ; alors que pour des concentrations de 60% ,80% et 100% ce seuil est nul. C'est donc à partir de la concentration de 60% que la croissance de *Streptococcus thermophilus* est inhibée ; cette concentration constitue la concentration minimale inhibitrice (CMI) .

Tableau 7 . Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* .

Paramètres	Témoin	La différente concentration de l'extrait à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>				
	0%	20%	40%	60%	80%	100%
di (DO)	0.047	1.572	1.987	3	3	3
df(DO)	0.300	1.712	2.032	2.987	3	3
df-di(DO)	0.253	0.14	0.045	-0.013	0	0
S (%)	100%	55.34%	32.14%	0%	0%	0%
CMI	↓ CMI = 60%					

S : Taux de survie du microorganisme en % ;di : densité optique de la solution phénoliqueensemencée avant incubation ;df: densité optique de la solution phénoliqueensemencée après incubation ;DO : densité optique ;

1-1-5 / Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :

L'extrait du *Thymus vulgaris* des concentrations inférieures à 60% d'extrait inhibe, mais pas totalement, les *Streptococcus thermophilus*; ceci est illustré par la **Figure 11** et le **Tableau 8**.

Tandis qu'à 60% il y a inhibition presque totale du germe mis à l'étude, de sorte que le taux de survie est proche de 0.01% , cette solution(60%) constitue donc la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) .

Le rapport CMB/CMI est égale à 01 (CMB/CMI <2). Cela signifie que l'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* exerce un effet inhibiteur de type bactériostatique sur les *Streptococcus thermophilus*.

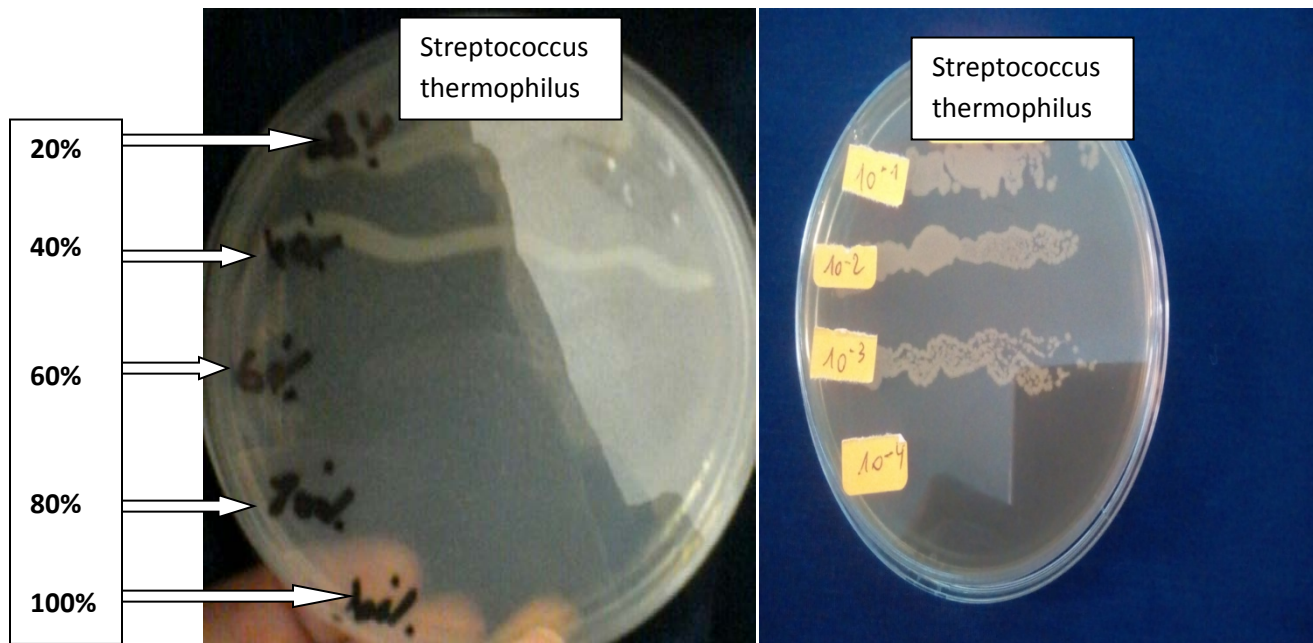


Figure 11. Détermination de la CMB de l'extrait des composants bioactif de thymus vulgaris sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* .

Tableau 8 : Effet inhibiteur de l'extrait des composants bioactifs de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

	CMI	CMB	CMB/CMI	Type d'inhibition
Extrait	60%	60%	1	Bactéricide
Normes	<p><u>D'après « Olivier , 2007 »</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ CMB /CMId 2 (effet bactéricide) ✓ CMB /CMId 2 (effet bactériostatique) <p><u>D'après « Marmonier ,1990 »</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ CMB /CMId 4 (effet bactéricide) ✓ CMB /CMId 4 (effet bactériostatique) 			

1--2/ *Lactobacillus bulgaricus* :

1-2-1/ Méthode de contact direct (Croissance microbienne)

L'effet des différentes concentrations d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* sont présentes dans le (**Tableau 9**).

L'examen des différentes boîtes de pétri révèle une diminution du nombre de colonies à partir d'une concentration de 20% d'extrait de thym (103.10^5) par rapport à celui du témoin 0% (137.10^5). Ce nombre continue à diminuer ($p \hat{=} 0,01$) avec l'élévation de la concentration de l'extrait à 40 et 60% (88.10^5 et 53.10^5 UFC/ml, respectivement) pour s'annuler à partir de 80% d'extrait, comme le montre **la figure 12**. Il y a donc un effet inhibiteur de la croissance du germe étudié, exercé par l'extrait de thym. L'analyse de variance montre que cet effet est hautement significatif.

Tableau 9 . Effet des différentes dilutions d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* (n= 3)

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Nombre de colonies (UFC/ml)	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	137 .10 ⁵	a				** (p<0,01)
20%	103 .10 ⁵		b			
40%	88 .10 ⁵		b			
60%	53 .10 ⁵			c		
80%	0				d	
100%	0				d	

Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d, : comparaison des valeurs moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls .

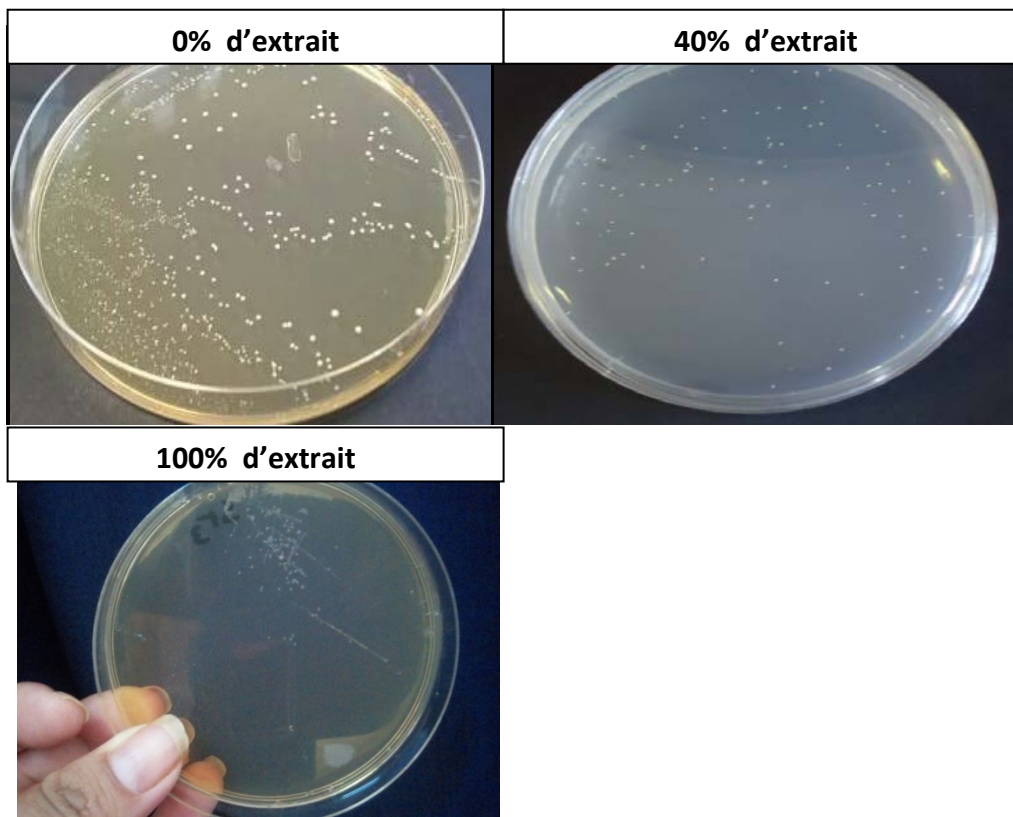


Figure 12 . Effet des différentes dilutions d'extraits a l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.

1-2-2/ Diamètres d'inhibitions (Méthodes des disques)

Le tableau ci-dessous rapporte les valeurs des zones d'inhibition développées avec les différentes concentrations de l'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* chez *Lactobacillus vulgaris*.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une concentration à une autre. Le (Tableau 10) ainsi que la (Figure13) montrent clairement la diminution du diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait de thym appliquée (100%, 80%, 60%, 40%, 20%, et 0%). Il est observé aussi de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenus, allant de 6,333 mm en présence d'une concentration de l'extrait de thym de 20% à 10 mm avec une concentration de 100%.

Tableau 10. Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur les variances des diamètres d'inhibition chez *Lactobacillus Bulgaricus* (n= 3)

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Diamètre d'inhibition (mm)	Ecart type	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	0	0				f	** (p\hat{A},01)
20%	6.333	0.577				d	
40%	6.667	0.577				d	
60%	7.667	0.577			c		
80%	8.333	0.577			c		
100%	10	1		b			
Antibiotique « pénicilline »	13.333	0.557	a				

Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d,e,f : comparaison des valeurs moyennes deux

à deux selon le test de Newman et Keul

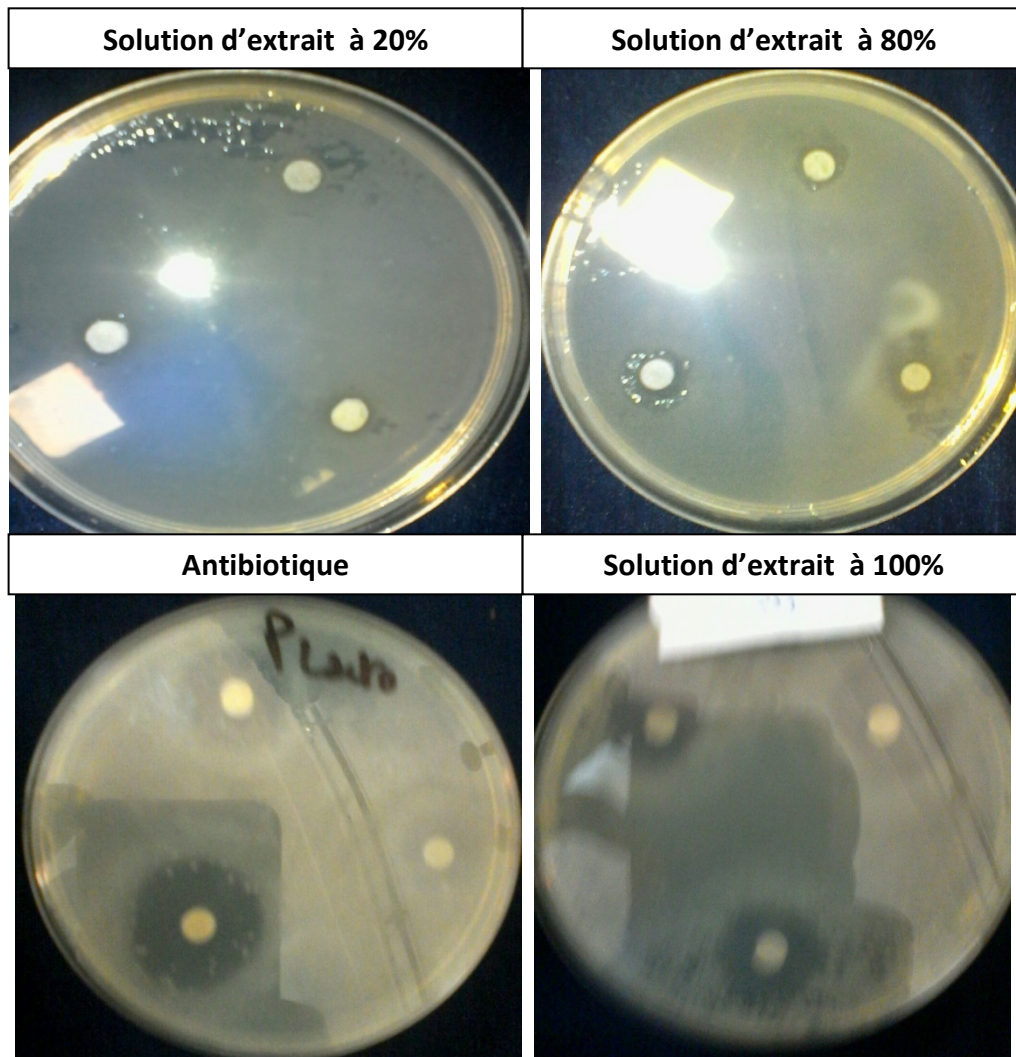


Figure 13 . Diamètres d'inhibition des solutions d'extrait de thym chez *Lactobacillus bulgaricus*.

1-2-3- Taux d'inhibition :

L'analyse de variance montre des taux d'inhibition très élevés ($p \leq 0.01$) de 57.501%, 62.502% et 75.002% , respectivement pour les concentrations d'extrait de *Thymus vulgaris* de 60%, 80% et 100%. Par contre, le taux d'inhibitions enregistrés avec les concentrations de 40% et 20% sont plus faible (50 et 47%) comparativement à ceux obtenus par au préalables. (**Tableau 11**) .

Tableau 11. Effet des différentes dilutions d'extraits à l'éthanol de *Thymus vulgaris* sur les variances de taux d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus* (n= 3) .

Concentration de l'extrait à l'éthanol de thym	Taux d'inhibition (%)	Ecart type	Groupes Homogènes				Effet de la concentration d'extrait de thym
0%	0	0				f	** (p<0,01)
20%	47.50	4.33				d	
40%	50.00	4.33				d	
60%	57.50	4.33			c		
80%	62.50	4.33			c		
100%	75.00	7.5		b			
Antibiotique « pénicilline »	100	0	a				


Les résultats sont représentés en valeurs moyennes, suivit de leurs écart type ;** effet hautement significatif du facteur étudié (concentration d'extrait à l'éthanol du thym) ; n : nombre des répétitions ; a,b,c,d,e,f : comparaison des valeurs moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keul

1-2-3/ Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le (Tableau 12) rapporte les résultats de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits de thym vis-à-vis du germe étudié *Lactobacillus bulgaricus*.

L'extrait de *Thymus vulgaris* à une concentration de 20% laisse un taux de survie de *Lactobacillus bulgaricus* de 58.50% , ce taux diminue à 23.50% pour une concentration de 40% , pour s'annuler de manière absolue à partir de la concentration de 60% ; ou le germe mis à l'étude apparaît incapable de survivre après 18 heures d'incubation à la température de 37°C . Cette dernière concentration est retenue comme étant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .

Tableau 12 . Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait des de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* .

Paramètres	Témoin	Les différents concentration de l'extrait à l'éthanol de <i>Thymus vulgaris</i>				
	0%	20%	40%	60%	80%	100%
di (DO)	0.021	2.637	2.896	3	3	3
df(DO)	0.221	2.754	2.943	3	3	2.834
df-di(DO)	0.200	0.117	0.047	0	0	-0.166
S (%)	100%	58.50%	23.50%	0%	0%	0%
CMI	 CMI = 60%					

S : Taux de survie du microorganisme en % ;di : densité optique de la solution phénoliqueensemencée avant incubation ;df: densité optique de la solution phénoliqueensemencée après incubation ;DO : densité optique .

1-2-4/ Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :

Comme le montre la(**figure 14**),les concentration inferieures à 40% d'extrait de *Thymus vulgaris* inhibent légèrement la croissances de *Lactobacillus bulgaricus* ; alors que 60% d'extrait ne laisse qu'un faible taux de croissance qui de la bactérie et proche de 0.01% de survie du germe, cette dernière concentration d'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* représente la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) de l'espèce microbienne étudiée.

A partir du rapport CMB/CMI égale à 01 elle s'avère que le *Thymus vulgaris* (extrait à l'éthanol) exerce un effet inhibiteur de type bactéricide sur les germes *Lactobacillus bulgaricus* .

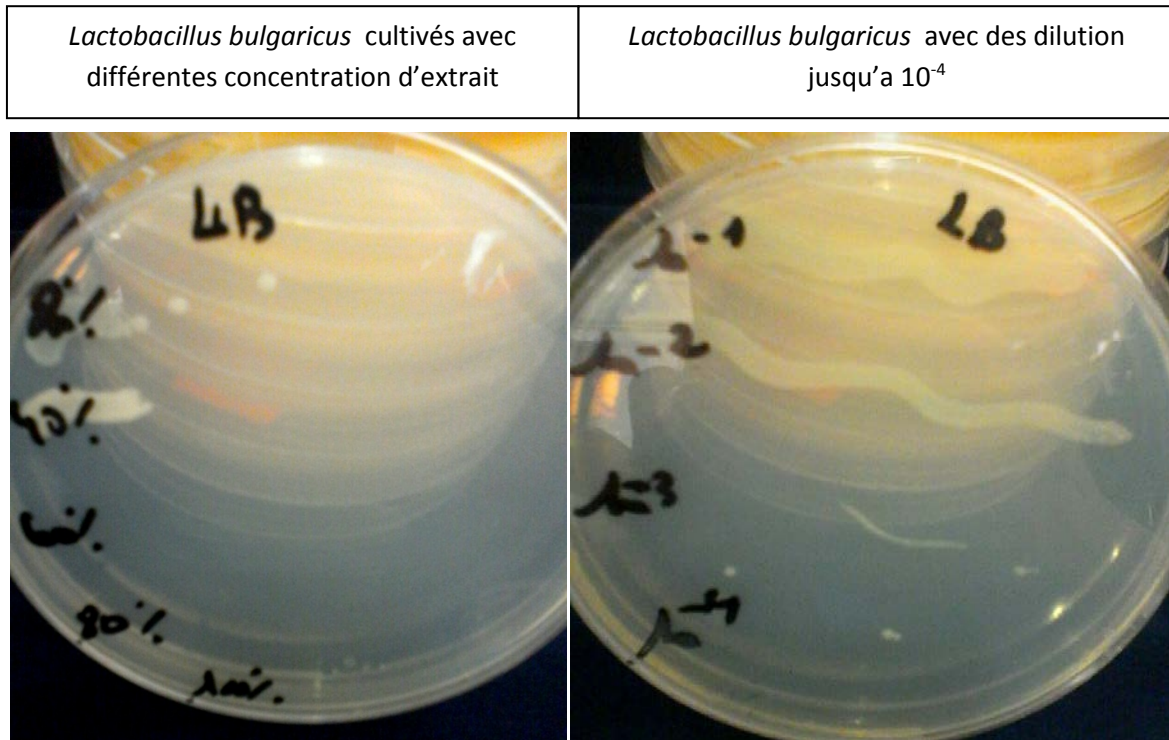


Figure 14. CMB de l'extrait à l'éthanol de Thym chez *Lactobacillus bulgaricus*.

Tableau 13 : Effet inhibitrice de l'extrait des composants bioactif de thymus vulgaris sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* .

	CMI	CMB	CMI/CMB	Type d'inhibition
Extrait	60%	60%	1	Bactéricide
Normes	<p><u>D'après « Olivier , 2007 »</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ CMB /CMId 2 (effet bactéricide) ✓ CMB /CMIE 2 (effet bactériostatique) <p><u>D'après « Marmonier ,1990 »</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ CMB /CMId 4 (effet bactéricide) ✓ CMB /CMIE 4 (effet bactériostatique) 			

2/ Discussion des résultats :

L'étude a révélé que le taux de croissance des deux bactéries étudiées diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de thym, pour s'annuler à 80%.

Par ailleurs les résultats des diamètres des zones d'inhibition ont montré que la bactérie *Streptococcus thermophilus* est très sensible vis-à-vis de l'extrait de *Thymus vulgaris*. Ces mêmes extraits développent des zones d'inhibition moyennement importantes chez les *Lactobacillus bulgaricus*. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 6.33 et 10 mm pour les deux souches.

Plusieurs études portées sur le pouvoir antimicrobien de certains extraits de *Thymus vulgaris*, (**Tabak et al.,1996, Ettayebi et al., 2000, Thuille et al.,2003, Bouhdid et al., 2006**) ont tous révélé leurs importantes activités chez nombreuses bactéries.

Nos résultats confirment ces travaux, puisqu'il a été constaté une forte activité antibactérienne des extraits de *Thymus vulgaris* chez les deux souches étudiées (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*), avec une CMB et une CMI de 60%. Le *Thymus vulgaris* semble exercer donc un effet de type bactéricide chez ces bactéries.

D'après **Cox et al. (2000)**, l'activité antibactérienne de l'extrait d'une plante aromatique est liée au profil chimique de ses constituants. En effet ; **Garda et al., (2011)** ont démontré que la nature antimicrobienne des composés bioactifs du Thym est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces, ce qui explique la sensibilité des souches étudiées qui augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait à l'éthanol de la plante.

Par ailleurs, **Pinto et al.(2004)** ont rapporté que les espèces du genre *Thymus*, qui contiennent une quantité importante de phénols, présentent un large spectre d'activité sur les germes bactériens et fongiques.

Au fait d'après (**Dorman et Deans ;2000**) la plupart des composés bioactifs sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés inhibitrices les plus importantes, dont les phénols et les huiles essentielles .

L'activité antimicrobienne de ces composés , résulte probablement d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Burt 2004 ; Carson et al. 2002, Skandamis et al. 2001**).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions susceptibles d'inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

La propriété hydrophobe qui caractérise les molécules présentes dans les huiles essentielles et extraits de plantes, permettent leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema et al. ;1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions, de composés intracellulaires et l'inhibition des enzymes membranaires intégrées (**Souza et al. 2013 ; Trombetta et al. 2005 ; Carson et al. 2002 ; Ultee et al. 2002 ; Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001, Skandamis et al.**

2001). Dans le cas où les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie ou si la perte de matériel est trop importante, cela entraîne la mort cellulaire (**Burt 2004**).

Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *Bacillus cereus*. Ce composé peut pénétrer dans la bicouche lipidique et se positionner entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, il est souvent observé observe une diminution de l'ATP intracellulaire ; mais aussi une diminution du potentiel membranaire (Ultee *et al.* 2002).

Conclusion

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'effet antibactérien des composés bioactifs du *Thymus vulgaris* extraits de la plante par usage d'un solvant polaire (l'éthanol) sur les deux germes *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* spécifiques du yaourt.

Les concentrations croissantes de l'extrait de thym testé ont témoigné une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des souches étudiées. A une concentration de 20% il a été enregistré une inhibition mais pas totale de la croissance des deux bactéries. L'effet inhibiteur est accentué pour des concentrations plus élevées notamment de 60, 80 et 100% donc pour des teneurs plus importants de l'extrait de thym en composés phénoliques, dont les plus répondus sont le thymol et carvacrol.

L'inhibition de la croissance de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* révèle des CMI et CMB avec les solutions d'extrait éthanoliques de 60%.

Apparemment, les extraits de *Thymus vulgaris* semblent exercer un effet de type bactéricide sur les deux bactéries étudiées *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Ainsi, en industrie laitière il serait plus intéressant d'introduire les extraits éthanoliques de thym à des concentrations inférieures à 60% afin de préserver les micro organismes bénéfiques et spécifiques de certains produits dérivés comme le yaourt, dont les *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

Références bibliographiques

- **AFNOR, 2000** : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P
- **Amiot, 2005**, *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier*.
- **Anonyme 2017** ; www.ultimayog.ca.
- **Balladin , D.A; Headley, O. (1999)**. Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herbs. *Renewable Energy*. **17**: 523-531.
- **Baudoux D., (2000)** L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. *Ed Atlantica antimycobacterial drug ethambutol*. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa **1996**, 15 : 11919-11924
- **Bego Ph. (2001)** - Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, pp.2-3.
- **Beirão & Bernardo-Gil, 2006** **Beirão ARB. and Bernardo-Gil MG., 2006**. Antioxidants from *Lavandula luisieri*. *2nd Mercosur Congress Engineering. on Chemical Portugal*. 8p.
- **Belaiche P. (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine.Paris.
- **Belanger A.E., Besra G.S., Ford M.E., Mikusova K., Belisle J.T., Brennan P.J.1969**, 99 : 242-248 administrated by various routes and different adjuvants in protecting mice against airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37 RV. *Amer. Rev. Resp.*
- **Benjlali B. (2004)** – Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59
- **Bergamaier,2002** production d'expolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de lactobacillus rhamnosus RW.959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum .thèse de doctorat ;université de laval ,canada
- **Billing J., Sherman P. W. (1998)** Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol.* 73: 3-49
- **Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006)** *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrnational de biochimies, Agadir*. 324-327.
- **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.
- **Bremness, L. 1996**. L'oeil nature: Les plantes aromatiques et médicinales Bordas Nature Paris. 303 P-
- **Bruneton J. (1999)** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *3^{ème} Ed Tec&Doc. Paris*.
- **Bruneton, J. 1993**. Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales. *2^{ème} édition*. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.

- **Burt, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- **Catty, S. 2001.** *Hydrosols, the next aromatherapy.* Healing Arts Press. Rochester. 290 p.
- **Camarda L., Di Stefano V. and Pitonzo R. (2008)** - Chemical composition of essential oils from *Athamanta sicula*. *Chemistry of Natural compounds*, 44 (4):532-533
- **Chalchat et al., 1997 Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997)** – Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75
- **Chun S. S., Vatter D.A., Lin Y.T., Shetty K. (2005)** Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem.* 40: 809-816.
- **Courtin P., Monnet M. and Rul F. (2002)** Cell- wall proteinases PrtS and Prt B have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures
- **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-582
- **Cox et al, 2000 Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR. and Wyllie SG., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology.* 88: 170-175.
- **Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998)** Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food chemistry.* 63 (3) : 373-383
- **Daroui-Mokaddem H., 2011.** Etude phytochimique et biologique des espèces : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolum olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Thèse de Doctorat. Option : Biochimie appliquée. Université Badji-Mokhtar, Annaba.
- **Dellaglio .F ;de Roissart .S ;Torriani .M.C Curk and D.Janssens (1994)** Bacteries lactique ,Volume I . Uriage .Lorica p 25. 30 et 48 .
- **Denis, F., E. Bingen, C. Martin, M.C. Ploy and R. Quentin, 2011.** *Bacteriologie Medicale.* 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.
- **Duraffourd C., D’Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990)** - Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2^{ème} éd. Masson, Paris
- **Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D. (2000)** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters.* 183:191-19
- **Fathy A.F.A., Abdelbaki M.M., El Warraki A.G. and Abbas S. (1965)** - Studies on the essential oil of Rosemary, 1- isolation of Rosemary oil. *Annals of Agri. Sciences, Faculty of Agri., University of Cairo,* 137-153.
- **France-Ida J. (1996)** - Bref survol de diverses méthodes d’extraction d’huiles essentielles. *Info-essence.* 3 : 5-6.

- **Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002)** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **65** : 1545-1560.
- **Guarda, J. F. Rubilar, J. Miltz and M. J. Galotto,** “The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 146, no. 2, pp. 144-150, 2011.
- **Guignard, J. L., 2000.** Biochimie végétale. Dunod, Paris., pp: 274.
- **Guinoiseau E., 2010.** Molécules, antibactérienne issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action. Thèse de Doctorat de l’Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.
- **H. J. D. Dorman and S. G. Deans 2000.,** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, no. 2, pp. 308-316.
- **Hammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 985–990.
- **Hernandez Ochoa L-R. (2005)** – Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d’origine végétale. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- **Hili P., Evans C. S., Veness R. G. (1997)** Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol* **24** : 269-275.
- **Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002)** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**: 691-700.
- **Hussain AI., Anwar F., Chatha SAS., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam PS., 2010.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology.* **41**: 1070-1078.
- **Iserin P. (2001)** Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.
- **Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M. (2004)** Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry.* **65** : 3279-3287
- **Kulšić T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006)** Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* **44** (4) : 485-492.
- **Jeannot, V.; Chahboun, J.; Russel, D.; Casablanca, H. 2003.** *Origanum compactum* Bentham: Composition of the hydrolat aromatic fraction, comparison with the essential oil and its interest in aromatherapy. *Int. J. Aromather.* **13**, 90-94
- **Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H. (2003)** Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* **401** : 7786.
- **Kohen et Nyska, 2002 Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* **30**: 620-650.
- **Kra, A.K.M., 2001.** Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d’une action antifongique de MISCAs contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle UFR Biosciences. Univ. Abidjan., pp: 126.

- **Lagunez-Rivera L. (2006)** - Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Lamoureux, 2002**, Exploitation de 'activité ² - galactosidase de culture de bifidobacteries en vue l'enrichir des produits laitiers en galato-oligosaccharides .memoires de maitrise , universite de laval .canada
- **Larpent J.P. (1989)** Microbiologie alimentaire. *Ed, techniques et documentation* ,Lavoisier. Paris ,p : 46, 1-117. in milk. *Microbiology*, 148,p : 3413 -3421.,
- **Madhavi DL., Deshpande SS. & Salunkhe DK., 1996.** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. 65p.
- **Mary, Teyssset .c de la torre f and grel J-R (2002).** increased production of hydrogen peroxide by lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus upon aeration ;.involvement applied and environmental microbiology.66(1) .2626-267 .
- **Morales, R. (2002)** The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. *Ed. Taylor & Francis, London.* pp. 1-43.
- **Moroh, J.L.A., C. Bahi, K. Dje, Y.G. Loukou and F. Guede-guina, 2008.** *Study of the antibacterial activity of Morinda morindoides(Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of Escherichia coli strains.* Bulletin Societe Royale des Sciences Liege, 77: 44-61.
- **Narishetty et Panchagnula, 2004 Narishetty STK., Panchagnula R., 2004.** Transdermal Delivery of Zidovudine: Effects of Terpenes and Their Mechanism of Action. *Journal of Controlled Release.* **95**: 367-379.
- **Ngounou C., Ndjouenkeu R., Mbofung F Et Noubi I. (2003)** Mise en évidence de la biodisponibilité de calcium et du magnésium au cours de la fermentation dulait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé du Zébu. *Journal of Food Engineering*, 57,p : 301-307
- **Ultee A., Slump R. A., Steging G. Smid E. J. (2000)** Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice. *J. of Food Protection.* 620-624.
- **Özcan M., J.-C. Chalchat (2004)** Aroma profile of Thymus vulgaris L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (4) : 68-73.
- **Paré J. (1997)** - Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.
- **Pariente L. (2001)** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2^{ème} Ed. *Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.
- **Pinto D.J., Lin C.D., Chen H.J. and Lin Y.H. (2004)** – Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipouroea batatas*) Lam «Tamong 57» constituents. *Botanical Bulletin of Academi. Sinica.* 45: 175-186.
- **Poletti A. (1988)** Fleurs et plantes médicinales. 2^{ème} Ed. *Delachaux & Nistlé S. A. Suisse.* Pp : 103 et 131. Quezel P. et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales *Ed C.N.R.S.* Tome I. 565 p.

- **Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein, 2003.** Microbiologie. De Boeck-Supérieur., pp: 1137.
- **Price, L; Price, S. 2004.** Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294 p.
- **Roussel . y ;Guedon . G ; SIMONET .jp and decarism .B ; (1994)**physical and genietic map of streptococcus thermophilus A054 .Jouranal of bacteriology.176(24).7413-7422.
- **Rudolf E. (1968)** - Gas-liquid chromatography of terpenes XVI, the volatile oil of the leaves of *Juniperus Aster*. Ashee. Can. J. Chem., 46 (5): 83-679.
- **Scheffer J.J.C. (1996)** - Various methods for the isolation of essential oils. Phytother. Res., 10:S6-S7.
- **Sikkema et al. 1994 , Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B. 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem., 269: 8022-8028
- **Skandamis et al. 2001Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K. & Nychas G. J. E. 2001.** Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. Ital. J. Food Sci., 13, 55–65
- **Souza E.L., Oliveira C.E.V., Stamford T.L.M., Conceição M.L. & Gomes Neto N.J. 2013.** Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, entérotoxine production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Braz. J. Microbiol., 44 (1), 29-35.
- **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.
- **Tabak et ses assistants (1996),** Antibacterial effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa* Turk. *J. Biol.* **30** : 239-242.
- **Tarmina D.F. –** Effectiveness of cell walls of *Mycobacterium bovis* strain BCG
- **Thuille N., Fille M., Nagl M. (2003)** Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health.* **206** : 217-221.
- **Trombetta et al. 2005 ;** Composition chimique et propriétés antioxydantes, antifongiques et anti aflatoxinogènes d'extraits d'origanum glandulosum Desf. et marrubium vulgare L (famille des lamiaceae).
- **Tsuchiya H. et Iinuma M. (2000)** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* **7**:161–5.
- **Vernon F.et Richard H. (1976)** - Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. APRIA, 2 (10) : 151-166
- **Viaud H. (1993)** - Les huiles essentielles, qualité distillation. GNOMA, Revue électronique. www.nature-helps.com/France/viaud2.htm
- **Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M., 1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. of Food Protection.* 58: 280– 283.
- **Wichtel M. et Anton R. (1999)** - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.

Les milieux de culture

❖ **Muller Hinton agar :**

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée	1000 ml

❖ **Bouillon nutritif**

-Peptone.....	5 g
-Extrait de viande.....	1 g
-Extrait de levure.....	2 g
-Chlorure de Sodium.....	5 g
-Eau distillée.....	1000 ml

❖ **Eau physiologique**

-Chlorure de Sodium.....	9 g
-Eau distillée.....	950 ml

PH =7 , autoclavage 120°c pendent 20min

❖ **Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE, 1974) :**

Peptone papainique de soja	5 g	² -Glycérophosphate de sodium	19 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g	Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25 g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g	Acide ascorbique	0,50 g
Extrait de viande	5 g	Agar-agar	15 g
Extrait de levure	2,5 g	Eau distillée	950 mL

pH= 7,2 ,Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.

❖ **Ī Milieu MRS (MAN *et al.*, 1960):**

Peptone	10 g	Acétate de sodium	5 g
Extrait de viande	10 g	Citrate d'ammonium	2 g
Extrait de levure	5 g	Sulfate de magnésium	2 g
Tween 80	1 mL	Sulfate de manganèse	0,005 g
Phosphate dipotassique	2 g	Agar-agar	5 g
		Eau distillée	800 mL

pH = 6,5,Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 mn à l'autoclave.

Résumé :

Ce travail a porté sur l'étude de l'effet des extraits à l'éthanol de *Thymus vulgaris* cultivé dans la région de Naama sur les deux germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

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

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

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

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

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

Summary :

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

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

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

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

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

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