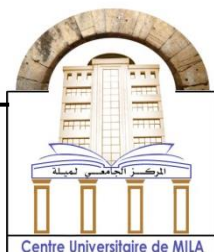


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N°Ref : .....

**Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila**

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de  
Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

**Utilisation des biomolécules de Thym comme agents anti-  
microbiens : application pour la bioconservation du lait  
cru de bovin.**

Présenté par :

- Benfadel Randa
- Ferroudj Aya

Devant le jury :

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| Président : | khennaoui Badis (MCA)   |
| Examineur : | Bouhekrit Moufida (MCA) |
| Promoteur : | Boutellaa Saber (MCB)   |

**Année Universitaire : 2021/2022**

## **Remerciements**

*Avant tout nous remercions **Allah** le tout puissant, de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour achever ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus cordiaux et notre vive reconnaissance à notre encadreur, le **Docteur Saber Boutellaa** qui a bien voulu accepter de diriger ce travail, pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité, ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives et pour sa patience tout au long de ce projet et sans lesquels, ce travail n'aurait pu aboutir.*

*Nous remercions les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements au **Mr Abdelhafid Boubendir** pour son grand soutien pour l'accomplissement de ce travail.*

## ***Dédicace***

### ***Je dédie ce travail à***

*Mon père, **LAMINE**, Qui peut être fier de trouver le résultat des Longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à Avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte Son fruit ;  
Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien Permanent  
venu de toi.*

*Ma mère, **MIMI**, qui a œuvrée pour ma réussite, de par son Amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux Conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, Reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de Mes sentiments et de mon  
éternelle gratitude.*

*Mes sœurs **SOUNDOUS MANAR, ARIDJ et SIDRAT EL  
MOUNETAHA.***

*Mon frère **WAIL***

*Ma tante **SAMIA** et sa fils **ABD ELBARI.***

*Toute ma famille **FERROUDJ et BOUKELOUHA.***

*Mes chers amis(es) **ROUQUIA, NADJELA, NAHLA, AYA et  
RANDA.***

*Toutes les personnes qui m'ont encouragé et m'ont aidé à réaliser ce  
travail.*

*Mes enseignants, **BOUTELLAA et BOUCHERITE.***

***AYA-LIDIA.***

## *Dédicace*

*A ceux, qui me sont chers : Je dédie ce travail.*

*Randa*

## **Sommaire**

### **Liste des abréviations**

### **Liste des figures**

### **Liste des tableaux**

### **Introduction ..... 1**

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre I : Le genre *Thymus***

#### **1. Description générale du genre *Thymus* ..... 5**

##### **1.1. Biogéographie ..... 5**

##### **1.2. Composition chimique de *Thymus* ..... 6**

###### **1.2.1. Huiles essentielles ..... 7**

###### **1.2.2. Polyphénols ..... 9**

##### **1.3. Domaines d'Application ..... 11**

###### **1.3.1. Usage thérapeutique..... 11**

###### **1.3.2. Usages culinaires et alimentaires ..... 12**

###### **1.3.3. Usages cosmétiques ..... 12**

###### **1.3.4. Autres utilisations..... 12**

##### **1.4. Activités biologiques..... 12**

###### **1.4.1. Activité antibactérienne ..... 13**

#### **2. Modes d'extraction des métabolites secondaires du *Thymus* ..... 16**

### **Chapitre II: Lait cru de vache et Méthodes de conservation**

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Définition du lait</b> .....   | 17 |
| <b>2. Élaboration glandulaire du lait</b> .....                                | 17 |
| <b>3. Composition du lait de la vache</b> .....                                | 18 |
| <b>4. Caractéristiques organoleptiques</b> .....                               | 19 |
| <b>4.1. La couleur</b> .....   | 19 |
| <b>4.2. L'odeur</b> .....  | 19 |
| <b>4.3. La saveur</b> .....  | 19 |
| <b>4.5. L'aspect</b> .....   | 19 |
| <b>5. Caractéristiques biologiques</b> .....                                   | 20 |
| <b>5.1. Vitamines</b> .....  | 20 |
| <b>5.2. Enzymes</b> .....  | 20 |
| <b>6. Caractéristiques physico-chimiques</b> .....                             | 20 |
| <b>7. Facteurs de variation de la qualité et la quantité du lait cru</b> ..... | 21 |
| <b>7.1. Facteurs intrinsèques</b> .....  | 21 |
| <b>7.1.1. Facteurs génétiques</b> .....  | 21 |
| <b>7.1.2. Stade de lactation</b> .....   | 21 |
| <b>7.1.3. Age et nombre de vêlage</b> .....                                    | 21 |
| <b>7.1.4. Etat sanitaire</b> .....   | 22 |
| <b>7.2. Facteurs extrinsèques</b> .....  | 22 |
| <b>7.2.1. Effet saisonnier et climatique</b> .....                             | 22 |
| <b>7.2.2. Alimentation</b> .....   | 22 |

|  |    |
|--|----|
| <b>8. Méthodes de conservation de lait</b> .....   | 22 |
| <b>8.1. Microfiltration</b> .....  | 22 |
| <b>8.2. Pasteurisation</b> .....   | 22 |
| <b>8.3. Stérilisation</b> .....  | 23 |
| <b>8.4. Réfrigération</b> .....  | 23 |
| <b>8.5. Conservation par les produits naturels</b> .....                                     | 23 |
| <b>9. Microbiologie du lait cru</b> .....  | 24 |
| <b>9. 1. Micro-organismes du lait</b> .....  | 24 |
| <b>9.1.1. Bactéries</b> .....  | 25 |
| <b>9.1.2. Levures</b> .....  | 25 |
| <b>9.1.3. Moisissures</b> .....  | 25 |
| <b>9.1.4. Autres microorganismes</b> .....   | 25 |
| <b>9.2. Principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait</b> ..... | 26 |
| <b>9.3. Qualité bactériologique du lait cru</b> .....  | 26 |
| <b>9.3.1. Flore originelle du lait</b> .....   | 26 |
| <b>9.3.2. Flore contaminants du lait</b> .....   | 26 |
| <b>9.3.3. Flore d'altération</b> .....   | 27 |
| <b>10. Dynamique de croissance microbienne</b> .....   | 30 |
| <b>10.1. Division bactérienne</b> .....  | 30 |
| <b>10.2. Croissance microbienne</b> .....  | 30 |
| <b>10.3. Courbe de croissance bactérienne</b> .....  | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <b>10.4. Paramètres de croissance bactérienne</b> ..... | 32 |
|---|----|

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III : Matériel et Méthodes**

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <b>1. Matériel végétal</b> ..... | 34 |
|----------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>1.1. <i>Thymus numidicus</i> Poiret</b> ..... | 34 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>1.2. Préparation de matériel végétal</b> ..... | 35 |
|---|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>1.2.1. Séchage</b> ..... | 35 |
|-----------------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>1.2.2. Broyage</b> ..... | 36 |
|-----------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>1.2.3. Préparation de l'extrait hydroéthanolique de <i>Thymus</i></b> ..... | 36 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>1.2.4. Préparation de solution mère de l'extrait hydroéthanolique</b> ..... | 37 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>2. Échantillonnage du lait</b> ..... | 39 |
|---|----|

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <b>2.1. Site de prélèvement</b> ..... | 39 |
|---------------------------------------|----|

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| <b>2.2. Prélèvement</b> ..... | 40 |
|-------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>3. Evaluation de l'activité antibactérienne</b> ..... | 41 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>3.1. Préparation du milieu de culture</b> ..... | 41 |
|--|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| <b>3.2. Eau physiologique</b> ..... | 42 |
|-------------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>4. Suivre de la cinétique de croissance microbienne</b> ..... | 43 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>4.1. Ajout de l'extrait hydroéthanolique au lait</b> ..... | 44 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>4.2. Préparation des dilutions décimales</b> ..... | 44 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>4.3. Dénombrement de la Flore Aérobie Totale Mésophile (FTAM)</b> ..... | 45 |
|--|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| <b>4.3.1. Principe</b> ..... | 45 |
|------------------------------|----|



|  |    |
|--|----|
| <b>4.3.2. Mode opératoire</b> .....                              | 45 |
| <b>4.4. Dénombrement des microorganismes psychotrophes</b> ..... | 46 |
| <b>4.4.1. Principe</b> .....                                     | 46 |
| <b>4.4.2. Mode opératoire</b> .....                              | 46 |
| <b>4.5. Détermination du nombre UFC/mL</b> .....                 | 46 |
| <b>4.6. Analyse statistique</b> .....                            | 47 |
| <b>4.7. Suivi le pH</b> .....                                    | 47 |

#### **Chapitre IV : Résultats**

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Aspect et rendement d'extraction</b> .....                                       | 48 |
| <b>2. Variation du pH</b> .....  | 49 |
| <b>3. Suivi de la croissance bactérienne</b> .....                                     | 49 |
| <b>3.1. Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)</b> .....                                | 49 |
| <b>3.2. Détermination des paramètres cinétiques de la croissance microbienne</b> ..... | 52 |
| <b>3.3. Flore spécifique</b> .....   | 55 |

#### **Chapitre V : discussion**

|                         |    |
|-------------------------|----|
| <b>Discussion</b> ..... | 57 |
| <b>Conclusion</b> ..... | 62 |

#### **Références**

#### **Annexes**

#### **Résumé**

## Liste des abréviations

**BL** : Bactéries Lactiques

**BS** : Bactéries Spécifique

**C<sub>1</sub>** : Concentration minimale de la solution mère (5mg/mL)

**C<sub>2</sub>** : concentration maximale de la solution mère (10mg/mL)

**CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice

**EEt** : extrait hydroéthanolique

**FTAM** : Flore Totale aérobie Mésophile

**G** : Le temps de génération

**GC/FID** : Chromatographie Gazeuse / Détecteur à Ionisation de Flamme

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée spectrométrie de masse

**HE** : Huiles Essentielles

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**Lag** : Le temps de latence

**MRS** : Man Rogosa et Sharpe

**Rd** : Rendement

**RMN** : résonance magnétique nucléaire.

**SM** : solution mère

**T** : Témoin

***T. numidicus*** : *Thymus numidicus* Poiret

**UFC** : Unité formant colonie

**UHT** : Upérisation à Haute Température.

**X<sub>min</sub> et X<sub>max</sub>** : densités cellulaires minimales et maximales

**Z.I** : Zone d'Inhibition

**μ<sub>max</sub>** : taux de croissance maximale

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Répartition du genre <i>Thymus</i> dans le monde.....  | 6  |
| <b>Figure 02</b> : L'anatomie et la physiologie de l'éjection du lait.....   | 18 |
| <b>Figure 03</b> : Effet de différentes conditions de stockage sur le nombre psychrotrophes protéolytiques (PPrBC) et le nombre psychrotrophes thermoduriques (TDPC) des échantillons de lait cru a, b et c ; à 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C, 10 °C et 12 °C. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne $\pm$ SE, (n = 9). ..... | 29 |
| <b>Figure 04</b> : Courbe de croissance généralisée d'une culture bactérienne .....  | 31 |
| <b>Figure 05</b> : Les phases principales des croissances bactériennes et les paramètres qui les caractérisent.....  | 32 |
| <b>Figure 06</b> : Représentation photographique de l'espèce <i>T. numidicus</i> Poiret. En floraison. ..  | 35 |
| <b>Figure 07</b> : La partie arienne de <i>Thymus numidicus</i> Poiret. ....   | 35 |
| <b>Figure 08</b> : Poudre de <i>Thymus numidicus</i> . ....  | 36 |
| <b>Figure 09</b> : Protocole de préparation de l'extrait hydroéthanolique de <i>T. numidicus</i> . ....  | 37 |
| <b>Figure 10</b> : Solution mère de l'extrait hydroéthanolique de <i>T. numidicus</i> . ....   | 38 |
| <b>Figure 11</b> : Site de prélèvement.....  | 39 |
| <b>Figure 12</b> : Prélèvement du lait cru .....   | 40 |
| <b>Figure 13</b> : Préparation de milieu de culture gélose nutritive .....   | 41 |
| <b>Figure 14</b> : Préparation du gélose MRS .....   | 42 |
| <b>Figure 15</b> : Préparation de l'eau physiologique. ....  | 43 |
| <b>Figure 16</b> : Ajout de l'extrait hydroéthanolique au lait. ....   | 44 |
| <b>Figure 17</b> : Préparation des séries de dilutions.....  | 45 |
| <b>Figure 18</b> : Suivi du pH pendant 10 jours. ....  | 47 |
| <b>Figure 19</b> : Suivi de l'évolution du pH au cours des jours de l'expérience. ....   | 49 |
| <b>Figure 20</b> : Flore Totale sur gélose nutritive .....   | 49 |
| <b>Figure 21</b> : L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C du Témoin. ....  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 22 :</b> L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de <i>T.numidicus</i> à 5 mg/mL. ....                        | 51 |
| <b>Figure 23 :</b> L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de <i>T.numidicus</i> à 10 mg/mL.....                        | 53 |
| <b>Figure 24 :</b> Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru réfrigérer à 4°C sur le temps de génération (G) par rapport au témoin.....                | 54 |
| <b>Figure 25 :</b> Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru sur la vitesse maximale de croissance $\mu$ max par rapport au témoin.....                | 55 |
| <b>Figure 26 :</b> Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru réfrigérer à 4°C sur le Niveau maximal de croissance $X_{max}$ par rapport au témoin..... | 56 |
| <b>Figure 27 :</b> Flore spécifique : <i>lactobacillus</i> (à gauche) <i>Staphylococcus</i> (à droite). ....  | 48 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 01</b> : Classification botanique de l'espèce <i>Thymus numidicus</i> Poiret. ....  | 5  |
| <b>Tableau 02</b> : Composition chimique de quelques espèces de <i>Thymus</i> en termes d'huiles essentielles.....                                     | 8  |
| <b>Tableau 03</b> : Composition chimique de quelques espèces de <i>Thymus en</i> termes des flavonoïdes. ....  | 10 |
| <b>Tableau 04</b> : Composition chimique de quelques espèces de <i>Thymus</i> en termes des acides phénoliques.....                                    | 10 |
| <b>Tableau 05</b> : Quelques exemples d'études de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la zone d'inhibition (Z I) de <i>Thymus</i> . .... | 15 |
| <b>Tableau 06</b> : Modes d'extraction des métabolites secondaires du <i>Thymus</i> .....  | 16 |
| <b>Tableau 07</b> : La composition moyenne des éléments du lait de vache .....   | 19 |
| <b>Tableau 08</b> : Caractéristiques physico-chimiques de lait de vache.....   | 20 |
| <b>Tableau 09</b> : Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance . ....   | 27 |
| <b>Tableau 10</b> : Concentrations, pourcentages et volumes ajoutés au lait.....   | 38 |
| <b>Tableau 11</b> : Les valeurs des paramètres de croissance bactérienne de la flore totale de lait..  | 52 |

# **Introduction**

### Introduction

Actuellement, la conservation et la sécurité des aliments sont la principale préoccupation des consommateurs et des producteurs d'aliments. La conservation des aliments est largement liée à la qualité et à la sécurité du produit alimentaire. Il s'agit d'un enjeu crucial dans la prévention des maladies d'origine alimentaire, à la fois graves et coûteuses. La conservation des aliments vise à maintenir l'intégrité et la qualité globale du produit (organoleptiques et nutritionnelle), à réduire le gaspillage alimentaire excessif, à prolonger la durée de conservation du produit et à préserver les nutriments pendant le transport (**Khalil *et al.*, 2021**).

Le lait est une excellente source de produits de composition différente. Il contient des protéines, des graisses, du lactose et diverses vitamines et minéraux et répond à une demande croissante des consommateurs pour des produits innovants de qualité constante. L'industrie laitière doit exploiter toute la richesse de cette matière première, simple d'apparence et complexe de composition (**Guetouache *et al.*, 2014**). En raison de sa haute valeur nutritionnelle, le lait cru est un milieu favorable pour la croissance d'un large éventail de micro-organismes. Plus de 160 espèces de bactéries ont été identifiées dans le lait cru. Ces bactéries proviennent de diverses sources, y compris l'air, le sol, l'eau, les trayons, et le matériel de traite contaminés (**Yaun *et al.*, 2019**). Par conséquent, nous devons introduire des techniques appropriées pour préserver cette substance importante.

Plusieurs techniques pour conserver le lait à des températures plus basses (la réfrigération, la congélation, etc.) et des techniques de conservation thermique (la pasteurisation, la stérilisation) et la conservation à l'aide de certains produits chimiques. (**Khalil *et al.*, 2021**). Bien que ces techniques contribuent à l'élimination des micro-organismes dans le lait, elles ont des effets néfastes sur le plan nutritionnel et sensoriel (**Hintz *et al.*, 2015**), et sur le plan sanitaire, elles peuvent provoquer des maladies tératogènes, cancérogènes et toxicité résiduelle (**Tzima *et al.*, 2015**), ainsi ces techniques conventionnelles sont limitées car la biodiversité microbienne laitière ont différentes conditions être défavorables pour sa croissance telles que les bactéries psychotrophiles, mésophiles et thermophiles la température de la mortalité des unes sera la de développement des autres (**Vithanage *et al.*, 2016**).

Aujourd'hui, les techniques de préservation modernes comme la bio-préservation, l'irradiation et les technologies d'obstacles sont également courantes. Dans les techniques de conservation traditionnelles, les aliments modifient leur état (nutritionnelle et organoleptique) et perdent certains nutriments (Singh, 2018), ces méthodes aussi ont plusieurs paramètres affectée la qualité de lait et directement la sécurité de cet aliment et il les doit suivre et contrôler de façon permanente et ils sont la température et le temps de stockage et la charge microbienne initiale qui provoquent des changement remarquable dans les composition du lait cru (Vithanage *et al.*, 2016 ; Vithanage *et al.*, 2017). Ainsi, les techniques modernes sont plus adaptées pour assurer la sécurité et la qualité des aliments. Il est également pertinent dans le monde d'aujourd'hui en raison de la mondialisation du marché alimentaire, de l'introduction de nouveaux aliments, des innovations de nouvelles technologies, de la demande de produits peu transformés avec une qualité prête à consommer et une durée de conservation plus longue (Singh, 2018).

L'utilisation de conservateurs alimentaires antimicrobiens naturels (bioconservation) pourrait garantir la sécurité et la qualité des aliments en tant qu'alternative à d'autres systèmes de conservation tels que les systèmes chimiques ou thermiques (Quinto *et al.*, 2019). La bioconservation utilise des conservateurs naturels contre un nombre élevé de micro-organismes pathogènes liés à l'alimentation ; ces conservateurs sont obtenus à partir d'animaux, des végétaux, des bactéries, de champignons, d'algues, de virus (Quinto *et al.*, 2019), ainsi que des bactériophages et les liquides nutritionnels comme le lait qui donne l'enzyme lactoperoxydase (Monique et Souad, 2013). La bioconservation alimentaire basée sur l'origine bactérienne donnée un exemple très fréquenté dans les aliments fermentés sont : les bactéries lactiques utilisées comme des cultures protectrices et leurs métabolites tels que : l'acide lactique, peroxyde d'hydrogène et les bactériocines comme la nisine cette additif lantibiotique connu sous le symbole : E234 qui a des effets antibactériennes sur les germes de Gram positive avec un haut performance et tolérance dans des conditions de température et pH extrêmes (Dortu *et al.*, 2009).

On sait que certaines épices et herbes confèrent une activité antimicrobienne. Bien qu'il existe des rapports contradictoires dans la littérature sur l'efficacité absolue de diverses épices et herbes, des chercheurs, déclarent que les épices, la Cannelle, la Moutarde, la Vanilline, le Clou de girofle et le Piment de la Jamaïque, et certaines herbes, en particulier l'Origan, le Romarin, le Thym, la Sauge, et le Basilic, confèrent tous une forte activité



antimicrobienne ainsi le thé vert, le pépin de raisin et le propolis qu'ils sont riches en substances antifongiques, antioxydant et antibactérienne (**Hintz et al., 2015 ; Monique, Souad, 2013 ; Tzima et al., 2015**).

Le Thym est une plante aromatique utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne comme thé chaude qui peut contenir des huiles essentielles et des composés hydrosolubles comme les acides phénoliques et les flavonoïdes pour le traitement des troubles digestifs et respiratoires, aussi il est utilisé comme agents épicés et additifs dans la préparation et la conservation des aliments grâce à leur potentiel antimicrobien (**Uritu et al., 2018., Ait Kaki et al., 2021**) ; ses plantes ont l'effet antibactériens, antioxydants et antifongiques sont considérés comme plus sûrs pour l'homme et l'environnement et économiquement ils peuvent faire une révolution dans le domaine agroalimentaire par le remplacement des conservateurs et des additifs alimentaires chimiques (**Morales, 2002., Uritu et al., 2018., Messara et al., 2018., Ait Kaki et al., 2021**). La richesse par des molécules bioactives phytochimiques comme les composés phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les tanins pourraient être responsables des activités antibactériennes, antioxydantes et antifongiques observées (**Ait kaki et al., 2021**).

Grâce aux composés phytochimiques divers de ces plantes leurs métabolites secondaires confèrent des propriétés organoleptiques et servent d'agents antimicrobiens et antioxydants. Les composés phénoliques sont généralement les plus efficaces. Sur la base de leurs structures chimiques un exemple simple de phénol est l'acide caféique, qui se trouve dans le Thym et l'Estragon et il est actif contre les champignons, les virus et les bactéries. Les flavonoïdes sont efficaces contre de nombreux micro-organismes en raison de leur capacité à se lier et à inactiver les protéines et à se complexer avec les parois cellulaires bactériennes (**Hintz et al., 2015**).

Il est à noter qu'il existe peu d'informations bibliographiques sur l'utilisation des extraits et des produits naturels comme additifs conservateurs pour assurer la consommation alimentaire quelles que soient leur qualité et leur sécurité, notamment dans cette étude le lait conservé à l'extrait de Thym ; Ainsi, l'enrichissement de ce domaine d'utilisation des conservateurs biologiques dans la conservation du lait favorisera la santé humaine et la sécurité alimentaire.

Dans ce contexte s'inscrit le travail en cours visant à rechercher de nouvelles substances naturelles d'origine végétale à activité antibactérienne en évaluant l'effet antibactérien de l'extrait de *Thymus numidicus* (extrait hydroéthanolique) sur les bactéries pathogènes et nous visons la possibilité d'utiliser cet extrait comme conservateur naturel pour lait de vache cru.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons articulé notre travail autour de deux parties la première partie a été consacrée à la synthèse bibliographique comportant deux chapitres ; le premier chapitre décrit les notions essentielles à la compréhension de notre travail (les principales informations sur l'espèce étudiée et l'activité antibactérienne). Le deuxième chapitre comprend des informations sur le lait cru de vache.

La deuxième partie réservée à l'étude expérimentale subdivisée en trois chapitres ; le premier chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail , le deuxième consiste à une analyse des résultats obtenus et le troisième présente une discussion.

# **Partie**

# **Bibliographique**

# **Chapitre I**

## **Genre *Thymus***

## 1. Description générale du genre *Thymus*

Au sein de la famille des *labiées* (*Lamiacées*), qui comprend environ 220 genres, le genre *Thymus* est l'un des huit plus importants en nombre d'espèces incluses dans le système de classification botanique. Plusieurs interprétations existent concernant l'origine du nom *Thymus*. Certains auteurs postulent que le nom latin *Thymus* vient du mot grec *Thymo* (parfum). Une autre interprétation de l'étymologie considère le mot grec *Thymos* (courage, force). À l'origine le genre *Thymus* décrivait un groupe de plantes aromatiques aux aspects similaires qui étaient utilisées comme stimulants des fonctions vitales (**Morales, 2002**).

### *Thymus numidicus* Poiret

L'espèce *Thymus numidicus* Poiret est une plante buissonnante, caractérisée par ces tiges érigées, feuilles en général lancéolées, 2 à 5 fois plus longues que larges. Les Fleurs roses sessiles ou presque, réunies à l'extrémité des rameaux en épis courts. C'est une espèce endémique Algéro-Tunisienne, sa période de floraison est souvent entre mois d'Avril jusqu'au début du Juillet tout dépend la zone géographique (**Quezel et Santa, 1962**). La position systématique est décrite dans le **tableau 01**.

**Tableau 01** : Classification botanique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret.

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| Règne         | Plantae                         |
| Embranchement | Magnoliophyta                   |
| Classe        | Magnoliopsida                   |
| Sous classe   | Asteridae                       |
| Ordre         | Lamiales                        |
| Famille       | Lamiaceae                       |
| Sous-famille  | Nepetoideae                     |
| Genre         | <i>Thymus</i>                   |
| Espèce        | <i>Thymus numidicus</i> Poiret. |

### 1.1. Biogéographie

*Thymus* est largement distribué dans l'ancien monde. La région méditerranéenne peut être décrite comme le centre du genre à proprement parler la région méditerranéenne occidentale. Seules les espèces de deux sections sont présentes en dehors de la méditerranée. Sept sections sont réparties sur la péninsule Ibérique et l'Afrique du nord-ouest (nord du Sahara du Maroc, Algérie, Tunis et Libye) cinq d'entre elles sont endémiques. Deux espèces sont communes dans les montagnes d'Ethiopie et une se trouve dans le sud-ouest des montagnes Arabiques. En Grèce 18 espèces sont enregistrées, 36 en Turquie et 17 dans la

flore iranienne. Plus à l'est, le *Thymus* se trouve sur la péninsule de Sinaï et les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à atteindre l'Himalaya. Les limites de la région tropicale jusqu'à l'est de l'Asie (japon et chine) (Morales, 2002)

En Algérie, le genre *Thymus* est représenté par 12 espèces (Morales, 2002) réparties dans plusieurs régions différentes ; Au nord, comme *T. pallescens*, dans la région des Aurès (Batna) et les monts du Djurdjura (Kabylie) à l'est, comme *T. dreatensis* ... (Hazzit et al., 2009) (figure 01).

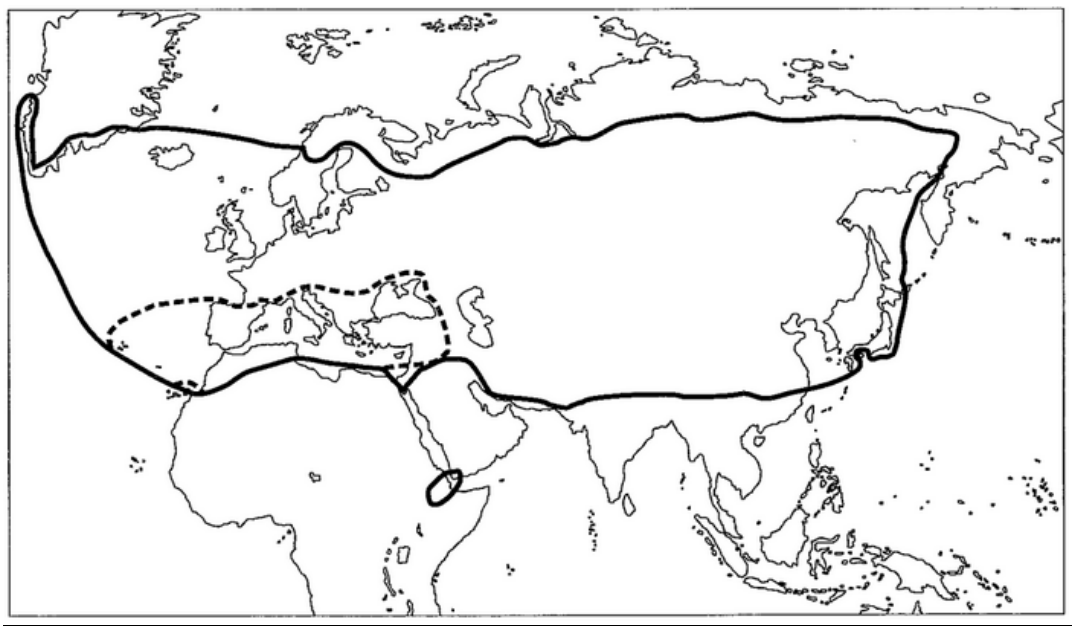


Figure 1 : Répartition du genre *Thymus* dans le monde (Morales, 2002).

## 1.2. Composition chimique de *Thymus*

Jusqu'à présent, diverses recherches sur les différentes espèces de *Thymus* du monde entier et en Algérie ont été menées. Des recherches chimiques antérieures sur des espèces de *Thymus* ont montré la présence d'huiles essentielles, de flavonoïdes et d'acides phénoliques.

La qualité de *Thymus* est généralement déterminée par leur teneur en huiles essentielles. Cependant, ils contiennent également des oligomères d'acide caféique (connus sous le nom de labiataetanins), des glycosides de flavonoïdes, des dérivés d'hydroquinone, des terpénoïdes, des bisphényles, etc (Fecka et Turek, 2007).

### 1.2.1. Huiles essentielles

**Kagama et al** ont mené une étude en **2022** pour déterminer la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et pour évaluer son potentiel antimicrobien contre *Phytophthora megakarya* (la bactérie qui cause la pourriture brune des cabosses de cacao). A partir de l'extrait hydrodistillat, la composition chimique a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les résultats ont montré que le rendement en HE de *Thym* était de 0,42 % avec le thymol (32,41 %), le  $\gamma$ -terpinène (19,65%) et le p-cymène (19,43 %) comme composants majoritaires.

**Galovičová et al., 2021** ont été menée Une étude pour analyser la composition chimique, l'activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm de l'huile essentielle de *Thymus serpyllum* de la région slovaque. La chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS) et la chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) de *T. serpyllum* HE ont été utilisées pour détecter les composés ; Les principaux composés se sont avérés être le Thymol, 18,8 %, Carvacrol 17,4%, o-Simen 15,4%, et geranol 10,7%.

**Nieto** a mené une revue en **2020**, donnant un aperçu des informations les plus importantes sur l'effet positif des composés bioactifs du thym et leurs utilisations comme conservateur alimentaire, compte tenu de leur origine (de plantes, d'extraits de plantes ou d'huiles essentielles) ; Cette revue a été étayée par une étude de **Ruta et al., 2008** décrit le profil des substances volatiles et l'activité antimicrobienne de *Thymus zygis subsp. gracilis* (Thymol et deux types chimiques de linalol) à partir des huiles essentielles extraites de sept plantes cultivées à Murcie (Espagne).

**Benomari et ses collaborateurs** ont mené en **2020** une étude visant à caractérisation des plantes aromatiques méditerranéennes, ils sont signalés dès la première fois la composition chimique de trois sous-espèces de *Thymus munbyanus* : *subsp. ciliatus*, *subsp. coloratus* et *subsp.* Huiles essentielles *abylaeus* en utilisant une combinaison de GC capillaire (RI) et GC/MS.

Plusieurs études ont été faites sur *T. numidicus* ; **Boughendjioua et Djeddi, (2018)** identifient les Propriétés sensorielles et physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thym* d'Algérie et en les reliant à leur composition chimique pour d'autres applications dans les industries alimentaires et pharmaceutiques en tant que produits de valeur. En **2014, Kouch et al** ont fait une comparaison entre les résultats obtenus dans leur étude des proportions des composants des huiles essentielles de *Thymus numidicus* et les résultats d'une étude menée par

**Hadef et al** en 2007, et il y avait une différence notable dans les proportions des composants trouvés dans les huiles essentielles des deux expériences; les chercheurs ont attribué la raison différence aux facteurs génétiques et environnementaux, la partie de la plante utilisée, son âge et la période de récolte. **Zellagui et al., 2014** ont mené une étude pour déterminer la composition chimique des huiles distillées à l'eau des feuilles de *Thymus numidicus* Poiret à Mila - Algérie par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS). Et Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles végétales essentielles. **Le tableau 02** montre les résultats de toutes les études qui ont été couvertes.

**Tableau 02** : composition chimique de quelques espèces de *Thymus* en termes d'huiles essentielles.

| Espèce                                       | Huiles essentielles  | Références                            |
|--|--|---------------------------------------|
| <i>T. Vulgaris</i><br>(Cameron)              | Thymol (32.41 %) Carvacrol (2.63 %)<br>$\gamma$ - Terpinène (19.65%) p-Cymene ( 19.43%)                                | <b>Kagma et al., 2022</b>             |
| <i>T. serpyllum</i><br>(Slovaquie)           | Thymol (18.80 %) Carvacrol (17.40 %)<br>O-Cymene (15.40%) Géraniol (10.70 %)   | <b>Galovičová et al., 2021</b>        |
| <i>T. zygis</i><br>(Espagne)                 | Thymol (22.30 %) Carvacrol (1.50 %)<br>$\gamma$ - Terpinène (2.90%) p-Cymene ( 24.70%)<br>linalool ( 3.50%)            | <b>Nieto, 2020</b>                    |
| <i>T. munbyanus</i><br>(Algérie,<br>Tlemcen) | Carvacrol (65.70 %) $\gamma$ - Terpinène (13.6%)<br>p-Cymene (7.90%) Myrcene (2.40%)                                   | <b>Benomari et al., 2020</b>          |
| <i>T. numidicus</i><br>(Algérie,<br>Skikda)  | Thymol (22.47 %) Carvacrol (27.38 %)<br>$\beta$ - pinène (5.97%) p-Cymene ( 9.41%)                                     | <b>Boughendjioua et Djeddi., 2018</b> |
| <i>T. numidicus</i><br>(Algérie,<br>Annaba)  | Thymol (77.50 %) Carvacrol (0.17 %)<br>$\beta$ - pinène (3.16%) p-Cymene ( 10.10%) $\gamma$ -<br>Terpinène (6.38%)     | <b>Kouch et al., 2014</b>             |
| <i>T. numidicus</i><br>(Algérie,<br>Mila)    | $\beta$ - Cymene ( 12.90%) Carvacrol (2.80 %)<br>Thymol (41.20 %) $\beta$ - Linalool (10.70%)<br>Chlorocresol (11.20%) | <b>Zellagui et al., 2014</b>          |



|  |   |   |
|--|---|---|
| <p><b><i>T. numidicus</i></b><br/><b>(Algérie, Annaba)</b></p> | <p>p- cymène (10.1%), <math>\gamma</math>- Terpinène (11.7%), <math>\beta</math> - Thymol (49.9%), Carvacrol (2.5%), Linalool (10%)</p> | <p><b>Hadef <i>et al.</i>, 2007</b></p> |
|--|---|---|

### 1.2.2. Polyphénols

**Bouymajane *et al.*, 2022** ont étudié le profil phénolique et les activités antioxydantes et antibactériennes d'extraits hydrométhanoliques prélevés sur les parties aériennes de *Thymus zygis subsp. gracilis* (Boiss.) R. Morales, *Mentha suaveolens Ehrh* et *Sideritis incana L.* récoltées dans le Moyen Atlas marocain (Ifrane).

De plus, d'autres chercheurs **Ait Kaki *et al.*** ont mené une étude phytochimique en **2021** qu'ils ont menée sur *T. numidicus*, qui a été collectée dans la région d'El-Kala, à partir d'un extrait butanolique analysé par CG et GC-MS ; et les résultats ont été qu'ils ont obtenu 15 composés phénoliques 8 sont des acides phénoliques et 6 sont des flavonoïdes.

En **2020**, **Bendif et ses collaborateurs** ont réalisé une étude de caractérisation complète des composants volatils et polaires extraits des parties aériennes de *Thymus munbyanus subsp. coloratus*, un arbuste utilisé comme ingrédient culinaire et comme médicament traditionnel en Algérie, un micro-extrait d'espace de tête en phase solide (HS-SPME) couplé à (GC-MS) a été utilisé pour évaluer les composants volatils, tandis que la composition phytochimique a été obtenue pour les résidus solides obtenus à partir de l'extraction avec des solvants de polarité différente par RMN intégrée et (LC-MSn).

**Jaouadi *et al.*, 2019** ont mené une étude sur la variabilité des composés phénoliques évalués chez 12 Tunisiens de *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., collectés dans quatre régions bioclimatiques différentes et ont déterminé l'efficacité de leurs extraits méthanoliques à agir comme antioxydants et antibactériens, ou à inhiber l'activité associée de l'acétylcholinestérase pour sa teneur en composés phénoliques.

Cette étude a été réalisée pour évaluer la récupération des métabolites à partir de différentes méthodes d'extraction appliquées aux parties aériennes de *Thymus algeriensis*. La méthode HPLC utilisant un détecteur à barrette de photodiodes avec gradient d'élution a été développée et validée pour l'estimation simultanée de différents composés phénoliques dans les extraits et dans leurs fractions purifiées correspondantes **Boutaoui *et al.*, 2018**.

En 2014, **Benayache *et al.***, ont mené une étude phytochimique sur *Thymus numidicus* Poiret région de Constantine à partir d'un extrait hydroéthanolique ; et les résultats ont été qu'ils ont obtenu 6 composés chimiques, dont 4 ont été décrits pour la première fois à partir de cette espèce (Cirsilineol, Circimaritin, Apigénine 7-O  $\beta$ -glucopyranoside, Luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside). **Les tableaux 03 et 04** présentent les résultats de toutes les études couvertes.

**Tableau 03 :** Composition chimique de quelques espèces de *Thymus* en termes des flavonoïdes.

| Espèce   | Flavonoïdes  | Références                            |
|--|--|---------------------------------------|
| <i>T. zygis</i><br>(Maroc)                           | Apigénine, Cirsimaritine, Naringénine, Hispiduline, Lutéoline  | <b>Bouymajane <i>et al.</i>, 2022</b> |
| <i>T. numidicus</i><br>(Algérie, El-Kala)            | Polydatine, Catéchine, Naringine, Hespéridine / Néohespéridine, Apigénine  | <b>Ait kaki <i>et al.</i>, 2021</b>   |
| <i>T. munbyanus</i><br>(Algérie, Bordj Bou Arreridj) | Gallocatéchol, Lutéoline-7-o-glucuronide, Quercétine -3-o glucuronide, Eriodicytyol 7-o-hexoside                   | <b>Bendif <i>et al.</i>, 2020</b>     |
| <i>T. algériensis</i><br>(Tunisie)                   | Cirsimaritine, Naringénine, Apigénine-o-hexuronide, Lutéoline-o-hexuronoïde  | <b>Jaouadi <i>et al.</i>, 2019</b>    |
| <i>T. algériensis</i><br>(Algérie, M'Sila)           | Epicatéchine, Rutine, Naringinine  | <b>Boutaoui <i>et al.</i>, 2018</b>   |
| <i>T. numidicus</i><br>(Algérie, Constantine)        | Circimaritin, Apigénine, Luteolin, Apigénine 7-O- $\beta$ -glucopyranoside, Luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside | <b>Benayache <i>et al.</i>, 2014</b>  |

**Tableau 04 :** Composition chimique de quelques espèces de *Thymus* en termes des acides phénoliques.

| Espèce                                    | Acides phénoliques   | Références                            |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>T. Zygis</i><br>(Maroc)                | Acide Quinique, Acide Caféique, Acide Rosmarinique, Acide Féruoylyquinique | <b>Bouymajane <i>et al.</i>, 2022</b> |
| <i>T. Numidicus</i><br>(Algérie, El-Kala) | Acide Fumarique, Acide Gentisique, Acide Caféique, Acide Vanillique,       | <b>Ait kaki <i>et al.</i>, 2021</b>   |

|  |   |                                     |
|--|---|-------------------------------------|
| <b><i>T. Munbyanus</i></b><br><b>(Algérie, Bordj Bou Arreridj)</b> | Acide Quinique, dérivé d'acide Caféique, Acide Rosmarinique, Acide Férulique          | <b>Bendif <i>et al.</i>, 2020</b>   |
| <b><i>T. Algériensis</i></b><br><b>(Tunisie)</b>                   | Acide Rosmarinique, Acide Salvianolique   | <b>Jaouadi <i>et al.</i>, 2019</b>  |
| <b><i>T. Algériensis</i></b><br><b>(Algérie, M'Sila)</b>           | Acide Syringin, Acide-o-Coumarique, Acide t-férulique, Acide 2,3- dimethoxy-benzoïque | <b>Boutaoui <i>et al.</i>, 2018</b> |
| <b><i>T. Vulgaris</i></b><br><b>(Algérie, Constantine)</b>         | Acide Caféique, Acide Gallique, Acide Ascorbique, Acide Férulique                     | <b>Koksal <i>et al.</i>, 2017</b>   |

### 1.3. Domaines d'Application

#### 1.3.1. Usage thérapeutique

Le Thym est connu depuis l'Antiquité, les pharaons l'utilisaient pour embaumer les corps des morts (Salehi *et al.*, 2019). Le Thym est utilisé depuis longtemps en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies, par exemple pour le traitement des maladies respiratoires (coqueluche, bronchite, asthme), sous forme de tisane, de pommade, de teinture, de sirop, ou par inhalation de vapeur. Il est également utilisé pour prévenir l'athérosclérose et traiter les traitements des maux de dents, les infections des voies urinaires et l'indigestion. Il expulse les champignons de l'estomac et de l'intestin et il a la capacité d'augmenter l'appétit en raison de son important composant thymol, qui a la capacité de tuer les bactéries et les parasites (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2015). Il contrôle également de nombreux effets précieux, tels que les antispasmodiques, les antifongiques, les propriétés de retardement du vieillissement des mammifères, les propriétés bactéricides, antiseptiques, antioxydantes et anthelminthiques, et a récemment été recommandé comme alternative comme agent de prévention du cancer (Abd El Kader et Mohamed, 2012). En particulier, les extraits de nombreuses plantes et herbes épicées orientales, telles que la Cannelle, le Clou de girofle, l'Ail, la Sauge, l'Origan, le Thym, le Romarin, la Menthe et la Vanille sont connus pour posséder des propriétés antimicrobiennes (Mousavi *et al.*, 2011). Il s'applique sur la peau et soulage les piqûres d'insectes. Il est utilisé en cas de douleurs sciatiques ou rhumatismales. Il traite également

l'herpès, le pied d'athlète, les aphtes, les infections fongiques, la gale et les poux (**Iserin, 2001**).

### 1.3.2. Usages culinaires et alimentaires

De nombreuses épices et extraits de plantes sont traditionnellement utilisés pour conserver les aliments (**Mousavi et al., 2011**), les Romains utilisaient la plante de *Thym* comme arôme pour le fromage et les boissons alcoolisées (**Salehi et al., 2019**). Avec ses avantages en saveur, arôme et conservation, il est utilisé comme assaisonnement et condiment pour les aliments (**Ündeğer et al., 2009**). *Le Thym* est largement cultivé en Europe et aux États-Unis pour une utilisation culinaire dans l'assaisonnement du poisson, de la volaille, des soupes et des légumes (**Özcan et Chalchat, 2004**). *Le Thym* produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de niche en Europe et en Asie (**Chikhouné, 2007**)

### 1.3.3. Usages cosmétiques

La plante de *Thym* est utilisée dans industries de la parfumerie (**Al-Bayati., 2007**). L'huile essentielle de *Thym* contient des éléments antiseptiques et cicatrisants qui sont utilisés dans les produits de soins de beauté (**kabouche, 2005**).

### 1.3.4. Autres utilisations

*Le Thym* a un large éventail d'utilisations, y compris la fabrication de savons, de parfums et de détergents (**Chikhouné, 2007**). *Le Thym* était utilisé à des fins spirituelles, les Grecs l'utilisaient comme encens dans les temples et source de courage (**Salehi et al., 2019**). De nombreuses espèces de *Stachys*, *Thymus* et *Satureja* sont utilisées comme plantes de rocaille (**Naghbi et al., 2005**).

## 1.4. Activités biologiques

Les espèces de *Thymus* sont couramment utilisées comme épice, tisane, insecticide et aromatisant. Aussi, le genre *Thymus* a été fréquemment utilisé en phytothérapie traditionnelle en raison de ses propriétés antiseptiques, carminatives, expectorantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires. Des études récentes ont montré que ce genre possède de fortes activités antifongiques, antibactériennes et antioxydantes. En raison de ces caractéristiques médicinales de ce genre, la transplantation de *Thymus* est pratiquée partout dans le monde (**Sunar et al., 2009**). Les huiles essentielles de *Thymus* ont des propriétés antiseptiques, antitussives et expectorantes grâce à la présence de Thymol et de Carvacrol. Les flavonoïdes et les acides phénoliques confèrent au *Thymus* de nombreuses activités biologiques, telles qu'antioxydant

(par les acides linoléiques), anticoagulants (par le thymol et biphényle), une activité antitumorale et une faible cytotoxicité (par les glycosides d'acétophénone) (**Fecka et Turek, 2007**). Des études récentes ont montré que les espèces de *Thymus* ont de fortes activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, spasmolytiques et antioxydantes (**Rahimmalek et al., 2009**).

#### 1.4.1. Activité antibactérienne

Le genre *Thymus* est considéré comme l'un des plantes médicinales efficaces à activité antimicrobienne, et cela a été prouvé par de nombreuses études antérieures menées par de nombreux chercheurs sur les différents types de ses composants (huiles essentielles, flavonoïdes, acides phénoliques, etc.).

**Bouymajane et ses collaborateurs (2022)** ont réalisé des travaux visant à étudier pour la première fois la structure phénolique, les propriétés antioxydantes et antibactériennes d'extraits prélevés sur les parties aériennes de *Thymus zygis subsp. gracilis*, *Mentha suaveolens* et *Sideritis incana* récoltées dans la région d'Ifrane au Maroc.

**Alimoradi et al., 2021** ont mené une étude pour évaluer les effets antibactériens de l'extrait de *T. daenensis* sur les bactéries d'origine alimentaire *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait éthanolique de *T. daenensis* a été préparé à partir des parties aériennes de la plante.

En **2021**, **Ait kaki et ses collaborateurs** ont mené une étude visant à caractériser les composants chimiques et à évaluer les activités antibactériennes et antioxydantes de l'extrait au 1-butanol (BuOH) des parties aériennes de *T. numidicus*.

Une recherche a également été menée sur le *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut pour estimer son activité antibactérienne, dont l'étude menée par **Messaoudi et ses collaborateurs** en **2019** qui vise à montrer l'action inhibitrice de la croissance bactérienne issue des extraits méthanolique et éthanolique de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

En **2013**, **Zeghib** a mené des recherches sur les activités biologiques du *Thymus*, notamment l'étude et l'évaluation de l'activité antibactérienne du *T. numidicus*, à partir de plusieurs extraits, dont l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

Les huiles essentielles (HE) et les extraits de méthanol des parties aériennes de *Thymus vulgaris* et *Pimpinella anisum* ont été évalués pour leurs activités antibactériennes

simple et combinées contre neuf espèces de bactéries Gram-positives et Gram-négatives par **Al-Bayati en 2007.**

**Tableau 05 :** Quelques exemples d'études de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la zone d'inhibition (Z I) de *Thymus*.

| Bactéries                     | Extrait hydrométhanolique de <i>T. zygis subsp. gracilis</i> (80/20 v/v) |          | Extrait éthanolique de <i>T. daenensis</i> (70/30 v/v) |              | Extrait butanolique de <i>T. numidicus</i> (70/30 v/v) |           | Extrait méthanolique de <i>T.algeriensis</i> (100/0 v/v) |           | Extrait hydroéthanolique de <i>T.algeriensis</i> (100/0 v/v) |           | Extrait hydroéthanolique de <i>T. numidicus</i> (25/75 v/v) |           | Extrait aqueux de <i>T. numidicus</i> (25/75 v/v) |          | Extrait méthanolique de <i>T. vulgaris</i> |          |
|-------------------------------|--|----------|--|--------------|--|-----------|--|-----------|--|-----------|---|-----------|---|----------|--|----------|
|                               | CMI (mg /ml)   | Z.I (mm) | Z. I (mm)  | CMI (mg /ml) | CMI  | Z. I (mm) | CMI (µg/ml)  | Z. I (mm) | CMI (µg /ml)   | Z. I (mm) | CMI (mg /ml)  | Z. I (mm) | CMI (mg/ml)                                       | Z.I (mm) | CMI (µg/ml)                                | Z.I (mm) |
| <i>S. aureus</i>              | 2.60   |          | 11   | 6            |  | 9.50      | 40   | 19        | 65   | 18.5      | 10  | 17        | 10  | 18.5     | 15.6                                       |          |
| <i>E. faecalis</i>            | 5.20   |          |  |              |  | 8.75      | 80   | 12.5      | 105  | 17        | 10  | 18        | 2.5   | 19       |  |          |
| <i>E. coli</i>                | 10.41  |          | 8  | -            |  | 8.00      | 220  | 13        | 270  | 10        | 10  | 17.5      | 10  | 18       | 250  |          |
| <i>P. aeruginose</i>          | 10.41  |          | 11   | 10           |  |           | 185  | 16.5      | 150  | 14        | 10  | 21        | 10  | 21       | >500                                       |          |
| <i>S. typhimurium</i>         | 20.83  |          |  |              |  |           | 110  | 9         | 130  | 12        |   |           |   |          | 250  |          |
| <i>K. pneumoniae</i>          |  |          |  |              |  |           | -  | -         | -  | -         |   |           |   |          |  |          |
| <i>E. cloacae</i>             |  |          |  |              |  |           | 160  | 7         | -  | -         |   |           |   |          |  |          |
| <i>Bacillus.cereus</i>        |  |          |  |              |  |           |  |           |  |           |   |           |   |          | 31.2                                       |          |
| <i>Proteus vulgaris</i>       |  |          |  |              |  |           |  |           |  |           |   |           |   |          | 31.2                                       |          |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.60   |          | -  | -            |  |           |  |           |  |           |   |           |   |          |  |          |
| <b>Références</b>             | <b>Bouymajane et al., 2022</b>   |          | <b>Alimoradi et al., 2021</b>                          |              | <b>Ait kaki et al., 2021</b>                           |           | <b>Messaoudi et al., 2019</b>                            |           |  |           | <b>Zeghib, 2013</b>   |           |   |          | <b>Al-Bayati, 2007</b>                     |          |

## 2. Modes d'extraction des métabolites secondaires du *Thymus*

Le règne végétal est caractérisé par sa richesse en métabolites secondaires qui sont utilisés pour différents intérêts, à la suite on mention les principales techniques d'extraction qui ont plusieurs produits et différents principes.

**Tableau 06** : Modes d'extraction des métabolites secondaires du *Thymus*

| Les techniques anciennes   |   |
|--|---|
| <b>Macération</b><br>(Srivastava <i>et al.</i> , 2021)                         | Est une ancienne technique qu'elle est peu coûteuse à un appareillage simple pour l'extraction des composés naturels actifs des plantes, elle consiste sur l'ajoute d'un solvant (eau, alcool) sur la poudre végétale puis filtré et récupéré le marc pour utiliser par d'autre processus d'extraction.   |
| <b>Infusion</b><br>(Pierre., Lis, 2007)  | Est basée sur l'ajoute de l'eau chaud ou tiède sur les plantes sèches ou frais pendant 10 minutes.  |
| <b>Décoction</b><br>(Pacôme <i>et al.</i> , 2018)                              | Le matériel végétal est versé dans l'eau à température ambiante et laissez la mixture chauffée jusqu'à l'ébullition entre 3-5 minutes pour les parties fragiles de plante (tige, feuilles,) et plus de 20 minutes pour les écorces et les racines.  |
| Les techniques récentes  |   |
| <b>Extraction par solvants organiques</b><br>(Boukhatem <i>et al.</i> , 2019)  | Consiste sur l'utilisation des solvants organiques de différentes solubilités qui se mélangent au matériel végétal sans réagir avec les molécules d'intérêt puis faire des rinçages et récupérer les solvants porteurs des essences aromatiques qui sont ensuite concentrés et distillés, les extraits finaux sont volatils ou non volatils.  |
| <b>Expression à froid</b><br>(Boukhatem <i>et al.</i> , 2019)                  | Est une méthode effectuée sans chauffage mais sous pression produite grâce à une force mécanique, elle est applicable surtout sur les agrumes pour extraire ses métabolites volatils.   |
| <b>Hydrodistillation</b><br>(Bertouche, 2009)                                  | Mise en place par le mélange d'eau avec la matière végétale dans un appareillage spécifique et soumis le chauffage jusqu'à l'ébullition, les vapeurs sont produites et condensées et les huiles essentielles sont séparées de la phase aqueuse mais reste le risque de détruire les molécules actives fragiles sous température élevée et la perte de certaines substances solubles dans l'eau. |
| <b>L'entraînement à la vapeur d'eau</b><br>(Boukhatem <i>et al.</i> , 2019)    | Utilisé pour extraire les huiles essentielles à partir le passage continu de la vapeur d'eau à travers les résidus végétaux secs et il sera saturé par des composés volatils qui auront condensés puis décantés pour les récupérer.   |
| <b>Extraction assistée par micro-ondes</b><br>(Boukhatem <i>et al.</i> , 2019) | Est une nouvelle technique qui basée sur le chauffage par ondes électromagnétiques qui provoquent une évaporation d'eau emprisonnée dans la plante sèche, il est couplé avec des huiles volatiles puis suivie par une distillation sèche.   |



**Chapitre II**

**Lait cru de vache et**

**Méthodes de**

**conservation**

## 1. Définition du lait

Le lait est le produit de la sécrétion des glandes mammaires de mammifères tels que les vaches, les chèvres et les brebis, et est destiné à l'alimentation des petits de l'animal nouveau-né (**Lapointe-Vignola, 2002**). Selon la définition officielle adoptée en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes de Paris « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée .il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Freund, 1997**). Le lait est produit par les cellules sécrétoires des glandes mammaires chez les mammifères. Il est destiné à l'alimentation des nourrissons. Riche en protéines et glucides. De nombreux produits laitiers sont fabriqués à partir de lait. Ses composants sont utilisés comme ingrédient dans des produits industriels (**Vilain, 2010**).

## 2. Élaboration glandulaire du lait

Le pis de la vache comprend quatre glandes individuelles, appelées quartiers. La peau du pis est couverte de poils fins ; cependant, la tétine est complètement glabre. Les moitiés droite et gauche de la mamelle se composent chacune d'un quart crânien (avant) et d'un quart caudal (arrière). Chaque côté de la mamelle est presque complètement indépendant de l'autre en ce qui concerne l'apport sanguin, l'innervation et l'appareil suspenseur (**Frandsen et al., 2009**).

La glande mammaire est constituée d'un épithélium tubulo-alvéolaire. Même si cet épithélium comprend différents types de cellules accessoires, telles que des adipocytes, des fibroblastes, des cellules myoépithéliales et des cellules endothéliales, il est principalement composé de cellules épithéliales organisées en alvéoles. Le lait est synthétisé au sein de ces cellules épithéliales. Il est ensuite sécrété dans la lumière alvéolaire et transporté via un réseau de conduits vers la citerne glandulaire. La capacité d'une glande mammaire à produire du lait est déterminée par le nombre de cellules sécrétrices et leur niveau d'activité (**Boutinaud et al., 2004**). Le mécanisme d'élaboration de lait est sous le contrôle des hormones lactogènes, dont la plus importante est l'hormone prolactine (**Meyer et Denis, 1999**).

L'éjection du lait de vache est provoquée par la contraction des cellules myoépithéliales entourant les alvéoles, qui répondent indirectement aux stimuli liés à la traite comme le contact des mains et des doigts du trayeur ou des serviettes de toilette sur les trayons de la vache activent les récepteurs nerveux de la peau des trayons (**Harding, 1995**).

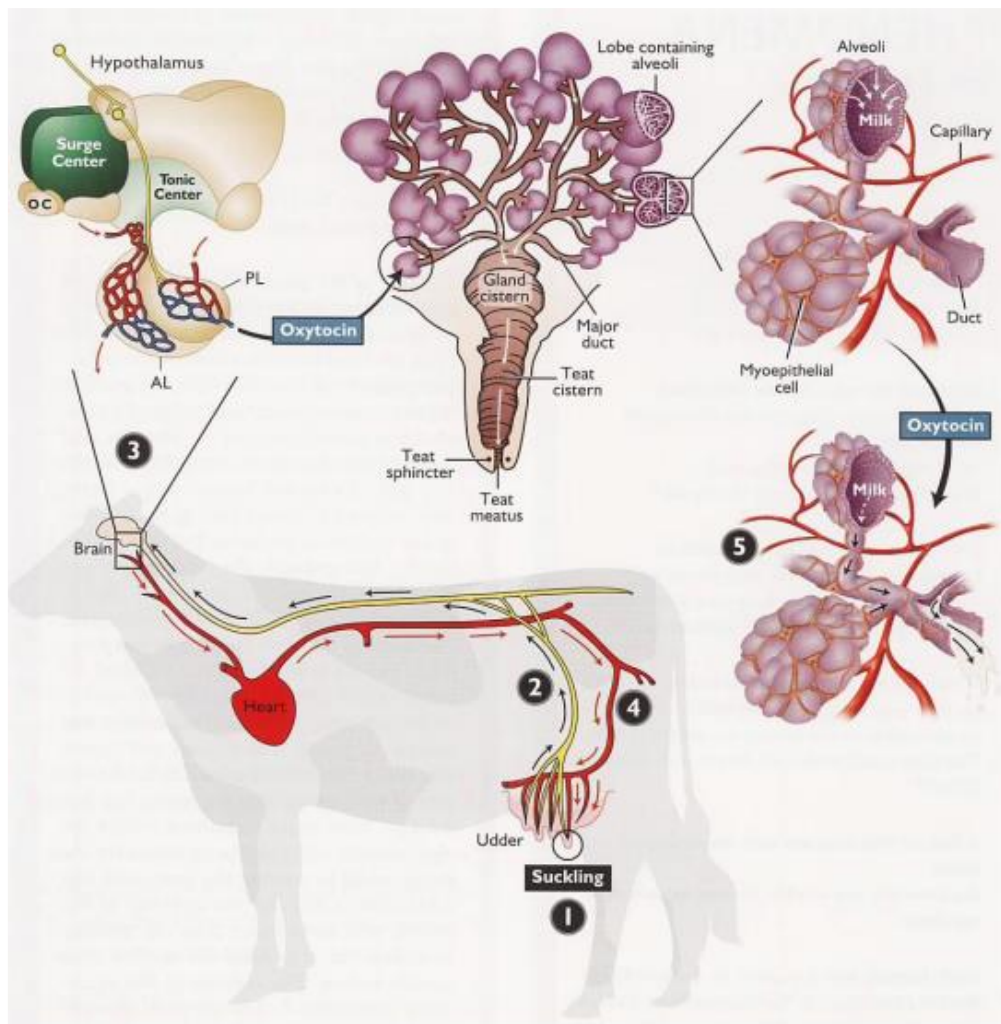


Figure 02 : L'anatomie et la physiologie de l'éjection du lait (Belmamoun, 2016).

### 3. Composition du lait de la vache

Le lait, aliment hautement nutritif par sa richesse en glucides, protéines, lipides, vitamines et sels minéraux (Aggad *et al.*, 2009). Ces proportions sont sous la dépendance de facteurs d'ordre génétique (race), physiologique (nombre de vêlages, époque de lactation, moment de la traite), zootechnique (mode de traite, fourrage) (FAO, 1995). Le tableau 07 donne la composition moyenne des éléments du lait de vache.

**Tableau 07** : La composition moyenne des éléments du lait de vache selon **FAO, 1995**.

| Constituants majeurs  |                         |                |                  |                  |               |                       |        |     |                  |       |
|-----------------------|-------------------------|----------------|------------------|------------------|---------------|-----------------------|--------|-----|------------------|-------|
| Protéines (34g/l)     |                         | Glucides (g/l) |                  | Eau (g/l)        | Lipides (g/l) | Sels minéraux (9 g/l) |        |     |                  |       |
| Caséines              | Protéines du lactosérum | Lactose        | Oligosaccharides | 902              | 37            | Ca                    | K      | Na  | Mg               | Na Cl |
| 25.1                  | 5.7                     | 48             | 0.1              |                  |               | 1.25                  | 1.5    | 0.5 | 0.12             | 1     |
| Constituants mineurs  |                         |                |                  |                  |               |                       |        |     |                  |       |
| Oligo-éléments (µg/l) |                         |                |                  | Vitamines (mg/l) |               |                       |        |     | Energie (Kcal/l) |       |
| Fer                   | Aluminium               | Cuivre         | Zinc             | C                | B12           | A                     | D      | E   | Calories         |       |
| 200-500               | 600-1000                | 20-40          | 3000-6000        | 8                | 0.0045        | 0.37                  | 0.0008 | 1.1 | 701              |       |

#### 4. Caractéristiques organoleptiques

**4.1. La couleur** : le lait est de couleur blanche, ce qui est dû en grande partie aux matières grasses, aux pigments de carotène (la vache transforme le carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait) **Rahmani, 2022**.

**4.2. L'odeur** : l'odeur caractéristique du lait vient du fait que les matières grasses qu'il contient fixent les odeurs animales liées à l'environnement de traite, à l'alimentation (les aliments à base de fourrage favorisent la flore beurrée - alors le lait prend une forte odeur), au stockage (acidification du lait avec l'acide lactique lui donne une odeur aigre) **Rahmani, 2022**.

**4.3. La saveur** : la saveur du lait frais normal est agréable. Le lait de vache a une saveur douce et agréable propre au lait **Rahmani, 2022**.

**4.5. L'aspect** : Le lait de vache est d'aspect homogène et ne contient pas de grumeaux **Rahmani, 2022**.

## 5. Caractéristiques biologiques

### 5.1. Vitamines

Toutes les vitamines connues sont présentes dans le lait de vache (FAO, 1995). Le lait est une bonne source de nombreuses vitamines hydrosolubles, dont la plupart des vitamines B (riboflavine, niacine, pantothénate, biotine, thiamine) qui interviennent, entre autres, dans l'utilisation des glucides, des acides gras et des acides aminés dans le métabolisme énergétique dans le corps, et cette propriété du lait est particulièrement importante pour un enfant en pleine croissance (Lapointe-Vignola, 2002)

### 5.2. Enzymes

Une soixantaine d'enzymes sont répertoriées dans le lait mais leurs rôles ne sont pas toujours clairement définis. Certaines sont des enzymes de dégradation (utile ou nuisible) comme les protéases (hydrolyse de la caséine), les lipases et d'autres sont des facteurs de rancissement, certaines possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique. L'enzyme la plus abondante du lait de vache est lactoperoxydase (agit contre les bactéries en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de thiocyanate). La quantité de certaines enzymes du lait comme la catalase est un indicateur de son niveau d'hygiène (FAO, 1995).

## 6. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait possède des propriétés liées à sa nature biologique, à savoir : variabilité, complexité, hétérogénéité et altérabilité (FAO, 1995) tableau 08.

**Tableau 08** : Caractéristiques physico-chimiques de lait de vache (FAO, 1995 et Grosch, 2014).

| Constantes   | Valeurs extrêmes             |
|--|------------------------------|
| Densité : à 20°C   | 1.028-1.033                  |
| à 15°C   | 1.029-1.039                  |
| PH à 20°C  | 6.6-6.8                      |
| Indice de réfraction   | 1.3410-1.3480                |
| Conductivité spécifique à 25°C (ohm <sup>-1</sup> . Cm <sup>-1</sup> ) | 4.0 - 5.5 x 10 <sup>-3</sup> |
| Potentiel Redox (volt)   | +0.30                        |
| Point d'ébullition (°C)  | 100.15-100.17                |
| Point de congélation (°C)  | -0.520 à -0.550              |
| Acidité de titration (°Dornic)   | 15-17                        |

## 7. Facteurs de variation de la qualité et la quantité du lait cru

La composition du lait varie en fonction de différents facteurs liés aux animaux (facteurs internes) et de facteurs liés à l'environnement et à la gestion de l'élevage (facteurs externes) (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 7.1. Facteurs intrinsèques

#### 7.1.1. Facteurs génétiques

Sont les facteurs ethniques associés aux effets de la sélection. Le lait des vaches frisonnes est moins riche en matières grasses et en protéines que le lait des vaches anglo-normandes (**FOA, 1995**). Le lait des vaches Montbéliardes et Tarentaises contient plus de caséine et de calcium que la race Holstein, ainsi que le temps de formation du caillé, les écarts variants entre 10 et 40 % selon les caractéristiques et les races (**Macheboeuf et al., 1993**). La race a un effet profond sur le rendement laitier mais un peu moins sur la composition du lait. Les races plus lourdes ont tendance à produire plus de lait (**Harding, 1995**).

#### 7.1.2. Stade de lactation

Avant le vêlage (les 6 à 9 jours suivants), la mamelle produit du colostrum, riche en protéines et en minéraux mais pauvre en lactose. Après cette période colostale, la quantité de lait augmente progressivement (pendant 1 mois) et se stabilise pendant 2 à 3 mois puis diminue jusqu'à se tarir au bout de 6 mois (**FOA, 1995., Frandson et al., 2010**). L'âge de lactation, ainsi que le stade de lactation, influencent également la qualité du lait. Il a été démontré qu'avec chaque lactation successive, la teneur en matières grasses diminue d'environ 0,05 % et la teneur en Solides non gras diminue d'environ 0,1 %. Ceci est dû en partie à une incidence accrue des mammites. En général, la production de lait augmente 30 % de la première à la cinquième lactation, mais le pourcentage d'augmentation diminue progressivement avec l'âge (**Harding, 1995**).

#### 7.1.3. Age et nombre de vêlage

**Veisseyre** a montré en **1979** que la quantité de lait augmente généralement du premier vêlage à la cinquième, puis décroît significativement et rapidement à partir de la septième. Les vaches vieillissantes provoquent un épuisement de leur lait, la richesse du lait en matière sèche a donc tendance à diminuer. Ces différences de composition sont attribuées à la détérioration de la santé du pis ; Selon l'âge, le nombre de mammites augmente et le pourcentage de protéines solubles, notamment celles du sang, augmente (**Benhedane, 2012**).

#### 7.1.4. Etat sanitaire

La mammite est l'une des maladies les plus importantes des vaches laitières, par son coût, sa fréquence et la plus pénalisante pour les élevages laitiers. Il en résulte souvent une forme floue et asymptomatique ou une modification visible du lait. Biologiquement, elle ne se manifeste que par une augmentation du taux de leucocytes et de cellules épithéliales détectées par différents tests de comptage cellulaire. Ces tests permettent d'évaluer la santé du pis et la qualité du lait destiné à la consommation. Cette pathologie affecte la qualité du lait et le bien-être animal (**Boufaïda Asnoune et al., 2012**).

### 7.2. Facteurs extrinsèques

#### 7.2.1. Effet saisonnier et climatique

Selon **Agabriel et al., 1997**, le nombre de cellules laitières en hiver est inférieur à celui en été, et donc la quantité de lait en hiver est inférieure à celle en été, et les niveaux de butyreux et de protéines sont les plus bas en hiver et les plus élevés en automne. A la fin de la saison cyclonique et pendant la saison froide (avril à septembre) le lait est plus riche en matières grasses et en protéines. La saison des pluies (février à mai) est caractérisée par un nombre élevé de cellules du lait et de spores butyriques ainsi qu'un faible rapport caséine/protéine et un faible taux de lactose. La concentration de spores butyrique son maximum en mai et juin (**Bony et al., 2005**).

#### 7.2.2. Alimentation

L'alimentation et le climat sont des facteurs interdépendants. En effet, le climat modifie le couvert végétal et donc la nutrition des animaux. La quantité et la qualité des aliments affectent directement la production et la composition du lait (**Meyer et Denis, 1999**).

## 8. Méthodes de conservation de lait

### 8.1. Microfiltration

La microfiltration appliquée au lait écrémé élimine la quasi-totalité des micro-organismes, sans perturber les enzymes internes du lait tout en préservant ses propriétés nutritionnelles et sensorielles intrinsèques (**Jeantet et al., 2008**).

### 8.2. Pasteurisation

La pasteurisation vise à éliminer toutes les formes végétatives de microorganismes pathogènes du lait, il existe 3 types de traitement.

**Pasteurisation basse (62-65°C/ 30 min)** : elle n'est réalisable qu'en batch et est abandonnée en laiterie.

**Pasteurisation haute (71-72°C/ 15-40s)** : elle est réservée aux laits de bonne qualité hygiénique. Au plan organoleptique et nutritionnel, la pasteurisation haute n'a que peu d'effets au niveau biochimique, la phosphatase alcaline est détruite, par contre la peroxydase reste active et les taux de dénaturation des protéines sériques et des vitamines sont faibles.

**Flash Pasteurisation (85-90°C/ 1-2s)** : elle est pratiquée sur les laits crus de qualité moyenne ; la phosphatase et la peroxydase sont détruites (**Jeantet et al., 2008**).

### 8.3. Stérilisation

Stérilisation visant à éliminer tous les micro-organismes, qu'ils soient végétatifs ou sporulés. C'est un lait de moins bonne qualité nutritionnelle et organoleptique que le lait pasteurisé.

**Stérilisation conventuelle** : le lait est pré-stérilisé (**130-140°C / 3-4s**) (après homogénéisation dans le cas des laits contenant de la matière grasse). Puis il est refroidi à 70-80°C et mis en bouteille avant de subir une deuxième stérilisation en autoclave (**115°C / 15-20 min**). Suivie d'un refroidissement rapide ces lait présentent des défauts de couleur et de gout et sur le plan nutritionnel, on observe des pertes en vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>.

**Stérilisation ultra haute température UHT** : le lait est traité à (**135-150°C / 1-6s**). Ce traitement permet de mieux préserver les qualités nutritionnelles et organoleptiques originelles du lait (**Jeantet et al., 2008**).

### 8.4. Réfrigération

La conservation du lait cru par réfrigération est maintenant largement répandue. Le lait est souvent stocké pendant 48 heures ou plus à 4-6°C (**Mottar, 1984**).

### 8.5. Conservation par les produits naturels

La progression de l'industrie alimentaire se tourne vers la nourriture verte « green Food » par le changement des conservateurs chimiques par celles naturels qui se trouve dans les produits naturels des plants ou des microorganismes qu'ils sont plus sains, sûres, plus sécurisées et efficaces pour allonger la durée de vie d'un aliment « prolongement de shelf-life » que les unes synthétiques et chimiques (**Moreno et al., 2017**). Ces produits naturels sont des métabolites secondaires prébiotiques organiques qui est fabriqués par les organismes vivants avec une grandes diversités de structures et leurs activités biologiques qui impliquent



dans la sélection naturelle et l'évolution des espèces, en plus de l'usage humaine dans la médecine traditionnelle ou nouvelle aussi l'intervention dans la recherche scientifique pour la synthèse et l'amélioration des produits pharmaceutiques (Nakanishi *et al.*, 1998). par ailleurs, ces produits naturels ont un rôle indispensables dans la conservation alimentaires.(Moreno *et al.*, 2017) et cosmétiques des préparations faits-maison ou industrielles (Beutigloo Paris, 2021).Ils s'appellent les additifs alimentaires qui sont des herbes antibactériennes et antioxydants qui empêchent les proliférations microbiennes et réduit les radicaux libres tels l'extrait des graines de figuier de barbarie(*Opuntia albicarpa* et *Opuntia ficus indica*) et les extraits de *Thymus shirazi*, Cannelle et de Romarin (Moreno *et al.* , 2017). En raison de ces découvertes, les produits chimiques seront plus en plus remplacés par des substances naturelles qui entrainera une révolution qualitative dans les méthodes des conservations alimentaires de manière sure et satisfaite pour l'environnement et pour la santé humaine (Moreno *et al.*, 2017).

En 2016, Boubendir *et al* ont mené une étude intitulée changements des populations bactériennes dans le lait cru réfrigéré collecté dans une région semi-aride d'Algérie. Des échantillons de 3 vaches ont été analysés immédiatement après leur (temps 0) et à différents temps (2, 5, 7, 12, 16, 21 jours) sur 21 jours de stockage réfrigéré pour évaluer leur qualité et leur sécurité microbiologique ainsi que la présence de pathogènes bactériens sélectionnés. Ils observent une croissance bactérienne limitée et lente a été observée pendant 21 jours de stockage réfrigéré. De plus, le consortium microbien était caractérisé par la présence d'un nombre limité d'espèces par rapport aux données de la littérature qui se réfèrent généralement à des échantillons de lait provenant de zones tempérées. Ils interprètent ces résultats La durée de conservation prolongée par rapport au stockage réfrigéré est censée être due à la présence possible de métabolites végétaux à activité antimicrobienne poussant dans les pâturages arides. Bien que préliminaires, les résultats de cette étude indiquent que les herbes arides dans les aliments pour animaux peuvent être exploitées en raison de leur bio-activité pour produire du lait avec des caractéristiques de sécurité améliorées et une durée de conservation améliorée.

## 9. Microbiologie du lait cru

Le lait collecté après la traite contient toujours des micro-organismes, le nombre et les espèces auxquelles ils appartiennent varient considérablement (FOA, 1985).

### 9. 1. Micro-organismes du lait

### 9.1.1. Bactéries

Prédominant parmi les micro-organismes présents dans le lait. Les cellules bactériennes sont de petite taille (généralement pas plus de quelques parties de millimètre, c'est-à-dire quelques micromètres ou micromètres). Les formes les plus courantes sont des cellules sphériques (coques) ou des bâtonnets (bacilles), plus ou moins régulières ou incurvé (**Callon et al., 2011**). En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories : bactéries saprophytes et les bactéries pathogène (**FAO, 1995**).

### 9.1.2. Levures

Ce sont des champignons dans lesquels l'état unicellulaire prédomine. La forme la plus courante est de forme ovale ou sphérique, dont la taille varie de 2 à 3  $\mu\text{m}$ , jusqu'à 20 à 50  $\mu\text{m}$  de longueur et 1 à 10  $\mu\text{m}$  de largeur (**Callon et al., 2011**). Bien qu'il soit souvent présent dans le lait, il est rarement impliqué dans les réactions qui se produisent dans le lait et seuls quelques-uns sont capables de fermenter le lactose. Certaines sont utilisées dans la production de laits fermentés et en fromagerie... et certaines d'autres peuvent être néfastes (**FAO, 1995**).

### 9.1.3. Moisissures

Sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Il produit des lipases et des protéases. Utilise du pénicillium pour recouvrir la croûte du fromage à pâte molle. Les mêmes moisissures peuvent également être indésirables en cas de développement excessif (**FAO, 1995**). Les moisissures sont des champignons filamenteux pluricellulaires, La taille des spores varie de 4 à 10  $\mu\text{m}$  de large et jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  de long (si pluricellulaires). Les filaments, de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de large, sont de longueur très variable (**Callon et al., 2011**).

### 9.1.4. Autres microorganismes

Si les laits peuvent renfermer divers **virus** (ex : *entérovirus*) ou **protozoaires** (ex : *Toxoplasma gondii*, agent de la toxoplasmose) potentiellement pathogènes pour l'homme, Parmi les virus, certains appelés bactériophages (phages) sont des **parasites** obligatoires des bactéries. Ils peuvent être ainsi présents sur le matériel et de façon quasi systématique dans les lactosérums. Il s'agit de structures de très petite taille (quelques dixièmes de micromètres) et nécessitant des techniques particulières pour leur mise en évidence (**Callon et al., 2011**).

## 9.2. Principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait

La croissance des micro-organismes peut être affectée par divers facteurs dans le milieu ou l'environnement, tels que le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments et la présence de substances antimicrobiennes. Des interactions entre les micro-organismes se produiront également (Callon *et al.*, 2011).

## 9.3. Qualité bactériologique du lait cru

### 9.3.1. Flore originelle du lait

Normalement, le pis d'un animal sain est habité par des bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus*, qui représentent plus de 50% de la flore totale du lait cru, suivies de *Corynebacterium*, *Escherichia coli* et autres. Nombre de microbes dans le lait tiré aseptiquement <1000 UFC/ ml, mais en pratique, il varie généralement de <1000 UFC/ ml à 2000 UFC/ ml (Özer et Akdemir-Evrendilek, 2014).

### Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques est défini comme un groupe de plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides pour produire de l'acide lactique. Ce sont généralement des coques ou des bacilles à Gram positif, persistants et non sporulés. On distingue principalement : les *Lactococcus*, les *Leuconostocs*, les *Pédiocoques*, les *Streptocoques thermophiles*, les *Lactobacilles mésophiles et thermophiles* et les *Enterococcus* (Axelsson, 2004).

### 9.3.2. Flore contaminants du lait

Après la sécrétion, la charge microbienne initiale du lait cru change en raison de micro-organismes provenant de différentes sources ; Environnement, mamelle infecté, matériel laitier...etc. les microorganismes contaminants, qui appartiennent à des genres différents, se répartissent comme suit : *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Microbactérium*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, levures et moisissures à des teneurs < 10%. *Lactococcus* et *Staphylococcus* à des taux variant de 30 à 99 %. La microflore contaminante du lait cru est classée en deux catégories : les altérations et les micro-organismes pathogènes pouvant provoquer des maladies animales laitières ou humaines (Özer et Akdemir-Evrendilek, 2014). *Staphylococcus aureus* produit des entérotoxines dont l'ingestion entraîne des vomissements, souvent accompagnés de diarrhée. *Salmonella* peut provoquer les mêmes symptômes caractéristiques d'une intoxication alimentaire, ainsi que *E.*

*coli*. *Listeria monocytogenes* peut provoquer une listériose qui touche préférentiellement les femmes enceintes (fausse couche), les nouveau-nés et les adultes immunodéprimés (septicémie, méningite). En plus de ces quatre bactéries pathogènes traditionnellement nécessaires au contrôle qualité, le lait contient probablement d'autres micro-organismes pathogènes tels que *Campylobacter jejuni*, *Yersinia colis*, *Bacillus cereus* ou *Aspergillus* (producteurs de mycotoxines) (Beuvier et Feutry, 2005).

### 9.3.3. Flore d'altération

La production de lait et leur stockage prennent toujours des limites d'hygiène et de qualité de lui strictement par plusieurs standards d'alimentation mondiale car ils sont liés directement avec la sécurité et l'état sanitaire pour ses consommateurs (Vithanage *et al.*, 2017).

#### Bactéries psychotrophes

La qualité, la sécurité du lait cru et la limitation de la durée de conservation de lait et leurs produits laitiers sont dépendants avec sa charge microbienne qu'ils ont des bactéries mésophiles comprend où premier temps après le traite 10% des psychotrophes qui ont un intérêt alimentaire qu'ils seront la flore dominante par 75% et créés une sélection aux les basses températures qui donnés cet avantage à ce flore donc ils sont un groupe bactérienne entre les psychrophiles et les mésophiles, Selon le critère de la thermo sensibilité on classer les bactéries on des thermophiles, mésophiles et psychrophiles qui ont un croissance maximal dans des intervalles du température optimale entre : [40°-55°], [20°-40°] et [5°-20°] respectivement (Bornert, 2000., Vithanage *et al.*, 2017., Machado *et al.*, 2017., Yabrir *et al.*, 2018). Le tableau 09 présente la classification des microorganismes selon leur température optimale de croissance.

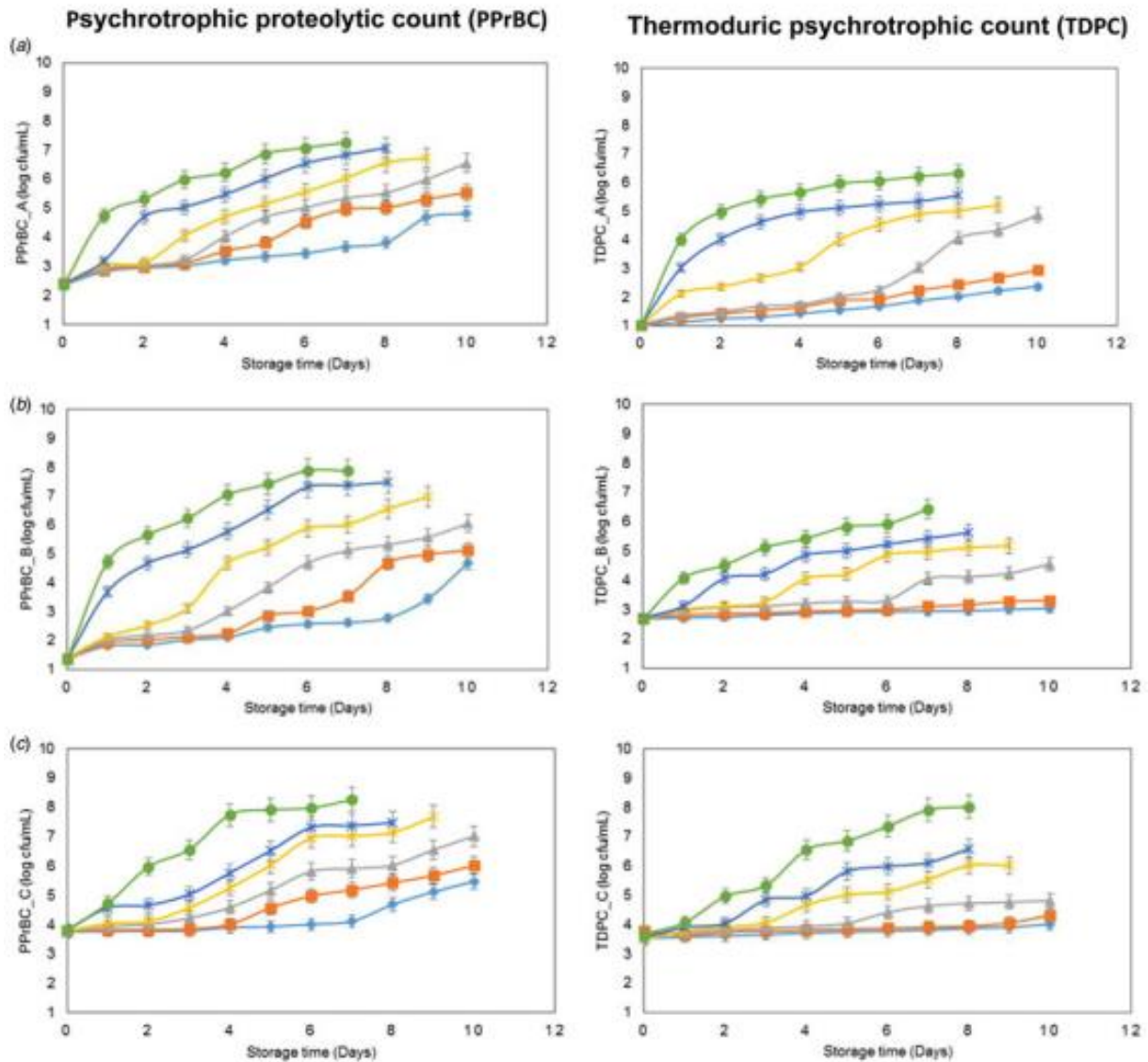
**Tableau 09** : Classification des microorganismes selon leur température optimale de croissance (Bornert, 2000).

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

Les bactéries psychrotrophes de lait ont plusieurs germes à la fois des Gram négatif « *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Hafnia*, *Achromobacter*, *Rahnella*, *Alcaligene*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* » et des Gram positif « *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* » (Vithanage *et al.*, 2017).

Les bactéries mésophiles psychrotrophes responsables à la détérioration de lait cru grâce à la présence des *pseudomonase fluorescense* et les *Bacillus cereus* qui rendent la flore psychrotrophile adaptative avec la variation thermique quand le *pseudomonase* vive à 4°C et la *Bacillus* vive à température supérieure à 8°C, si pour cela les standards de sécurité alimentaire considèrent que le lait de bien qualité est celle qui contient les *pseudomonase fluorescense* inférieur à 10<sup>7</sup> UFC/mL et les *Bacillus cereus* inférieur à 10<sup>5</sup> UFC/mL. Pour empêcher ou bien éliminer les germes alternatifs et pathogènes on traite le lait thermiquement soit par la baisse ou l'élevage de température car ils peuvent développer notablement dans la première et résister la deuxième même que la pasteurisation ou le traitement UHT par la sécrétion des toxines et/ou des enzymes thermorésistants extracellulaires tels que : les protéases, les lipases et les phospholipases qui donnent les activités protéolytiques et lipolytiques responsables à cette détérioration. (Bornert, 2000., Vithanage *et al.*, 2016., Vithanage *et al.*, 2017., Machado *et al.*, 2017., Bouchair *et al.*, 2021). Les bactéries protéolytiques (PrB) sont un type de bactéries qui peuvent produire des enzymes protéases, qui sont des enzymes qui peuvent décomposer les liaisons peptidiques dans les molécules de protéines. De nombreuses bactéries protéolytiques ont été trouvées dans le sol, l'eau, la boue et certaines souches de l'environnement. Cela rend les bactéries protéolytiques développer plus que d'autres des bactéries enzymatiques en raison de son abondance dans la nature et l'environnement en plus. Les bactéries psychrotrophes isolées à partir de lait cru réfrigéré présentaient une faible activité protéolytique « psychrotrophic proteolytic bacteria » de la plupart des souches gram négatives, Cependant, les micro-organismes psychrotrophes thermoduriques (TDP) survivent au traitement thermique, se propagent et produisent des enzymes, accélérant ainsi la détérioration. Les micro-organismes thermoduriques comprennent non seulement des bactéries, mais également des champignons capables de se développer à des températures de refroidissement et de produire des protéases (Maria *et al.*, 2010., Ribeiro Júnior *et al.*, 2017., Hamdani *et al.*, 2019). Vithanage et ses collaborateurs (2017) ont montrés que les meilleurs indicateurs de la qualité et la sécurité de lait cru pour

évaluer les besoins technologiques spécifiques à la ferme sont les données PPrBC « the psychrotrophic proteolytic bacteria count » (PPrBC: à  $\geq 4$  °C) et TDPC « thermotrophic psychrotrophic count » (TDPC: à  $\geq 8$  °C). Ainsi le nombre agrée des PPrBC et TDPC doivent être inférieures à  $5.10^4$  UFC/mL et  $1.10^4$  UFC/mL respectivement pour assurer l'extension de durée de vie de lait et respecter les conditions sécurisées de la vie humains (**Figure 03**).



**Figure 03 :** Effet de différentes conditions de stockage sur le nombre psychrotrophes protéolytiques (PPrBC) et le nombre psychrotrophes thermotrophes (TDPC) des échantillons de lait cru a, b et c ; à 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C, 10 °C et 12 °C. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SE, (n = 9).

## 10. Dynamique de croissance microbienne

Lorsqu'elles sont placées dans du milieu frais (contenant toutes les conditions de croissance), les bactéries doivent d'abord faire certaines formulations et éventuellement modifier le milieu ; Cela se traduit par une latence de croissance une fois la multiplication effectuée à un rythme constant (la multiplication est exponentielle ou proche de celle-ci). En raison d'un manque de nutriments, la croissance ralentit puis s'arrête (**Flandrois, 1997**).

### 10.1. Division bactérienne

C'est le mécanisme impliqué dans la reproduction asexuée des bactéries. Ils sont les plus courants dans le processus de fission binaire lorsqu'une cellule se divise en deux cellules filles identiques. En outre, il peut inclure plusieurs bourgeons de fission et la production de spores. Initialement la cellule bactérienne s'allonge en allongeant ces membranes et la paroi cellulaire en plus d'augmenter la taille de la cellule, la cellule copie l'ADN en deux copies de son chromosome avec la formation du septum qui apparaît comme un anneau au milieu de la cellule allongée Enfin, la cellule est coupée en deux cellules filles de taille et de matériel génétique égaux. Ce cycle cellulaire dure environ 20 minutes pour une culture bactérienne active d'*E. coli* (**Bruslind, 2022**).

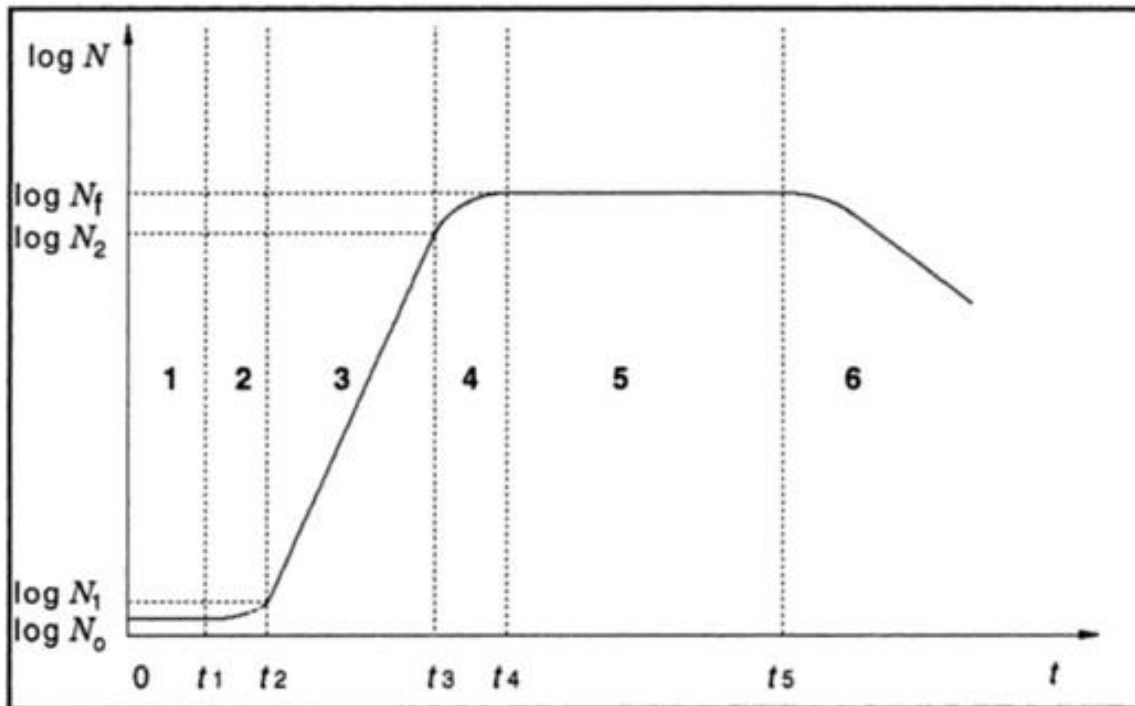
### 10.2. Croissance microbienne

Il s'agit d'une multiplication rapide d'une souche bactérienne dans des conditions favorables pour celle-ci. Ces nutriments ont la bonne température et le bon pH. La croissance des microbes peut être bonne pour l'homme (production de levure, de vinaigre et de produits laitiers fermentés). Il peut contrôler ou prédire l'évolution bactérienne en ajustant les conditions de cette évolution (**Bruslind, 2022**).

### 10.3. Courbe de croissance bactérienne

Depuis la première description par **Buchanan, 1918**, il est d'usage de distinguer plusieurs étapes dans la croissance des cultures bactériennes. Ces étapes sont caractérisées par certaines valeurs ou variations dans le taux de croissance d'une culture. Par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (**figure 04**) :





**Figure 04 :** Courbe de croissance généralisée d'une culture bactérienne  
(Buchanan, 1918).

**1. Phase de latence :** Il se caractérise par un taux de croissance nul. Cette étape correspond à la période d'adaptation de la bactérie à son nouveau milieu de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu hôte, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum.

**2.** La phase de taux de croissance croissant qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale.

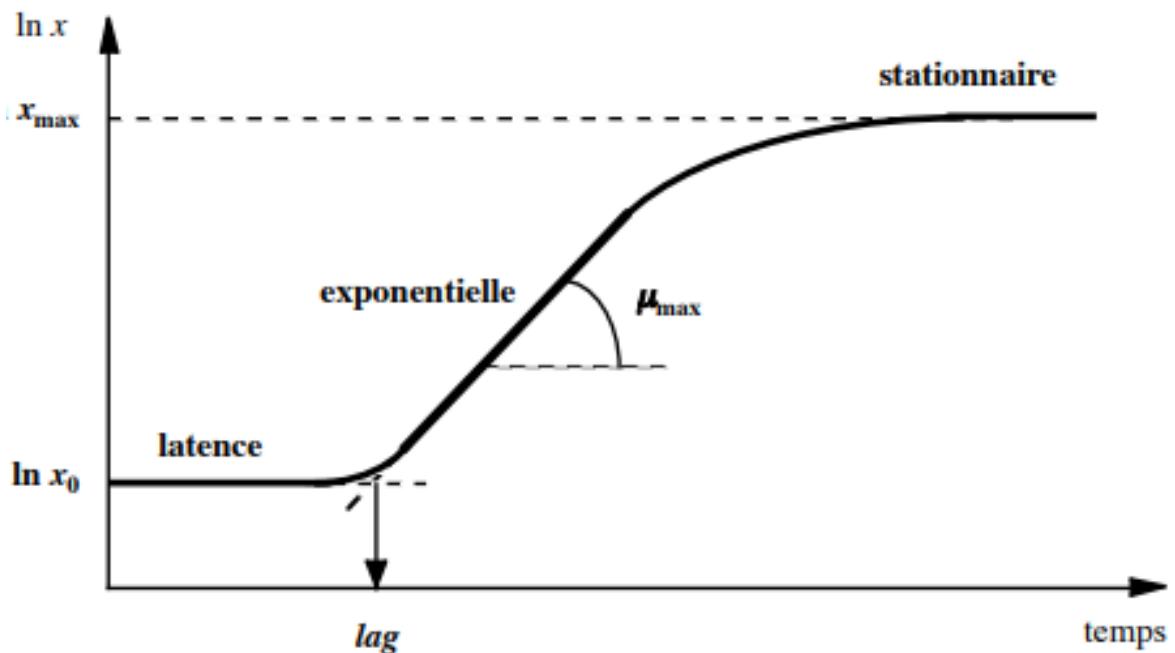
**3. phase exponentielle :** La phase de croissance à pleine vitesse constante ou la phase de croissance exponentielle. Elle est présentée sous forme de fraction linéaire lorsque l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse est représentée en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de ce taux de croissance maximal dépend des caractéristiques du milieu de culture.

**4.** La phase de taux de croissance décroissant, qui devient progressivement nul.

**5. Phase stationnaire maximale** ou plus simplement phase stationnaire qui correspond au retard de croissance, après quoi la culture atteint sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance est dû à l'épuisement d'un nutriment ou à une autre modification des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des microorganismes.



**6. la phase de début de décroissance** Ainsi, la cinétique de croissance des cultures bactériennes consiste principalement en une **phase de latence** suivie d'une **phase exponentielle** puis d'une **phase stationnaire**. Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : densité cellulaire initiale ( $x_0$ ), temps de latence ( $lag$ ), taux de réussite maximal ( $\mu_{max}$ ) ou temps de génération ( $T_g$ ) et densité maximale atteinte ( $X_{max}$ ) **Figure 05**.



**Figure 05** : les phases principales des croissances bactériennes et les paramètres qui les caractérisent (Augustin, 2005).

#### 10.4. Paramètres de croissance bactérienne

- 1. Temps de génération (G) :** Le temps de génération est le laps de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire pour multiplier le nombre de bactéries. Dans une communauté bactérienne, toutes les cellules ne se développent pas au même rythme. Le temps de génération varie selon les espèces considérées et les conditions de culture (FOA, 1985).
- 2. Taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) :** Le taux de croissance est le nombre de divisions par unité de temps, c'est-à-dire l'inverse du temps de génération (FOA, 1985). Est la pente correspondant à la phase exponentielle (Augustin, 2005).
- 3. Temps de latence (lag) :** C'est le temps nécessaire aux bactéries pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (UMVF, 2014). Qui est l'intersection de la ligne correspondant à la phase exponentielle avec la ligne horizontale passant par la concentration initial ( $x_0$ ) (Augustin, 2005).

**4. La densité cellulaire (X) :** est représentée la biomasse de la culture bactérienne ; elle s'appelle aussi la concentration microbienne initiale ( $X_0$ ) au début de la phase exponentielle et maximale ( $X_{\max}$ ) à la fin de cette phase (**Augustin, 2005**).

# **Partie**

# **Expérimentale**

# **Chapitre III**

## **Matériel et Méthodes**

L'objectif de ce travail est la prolongation de la durée de vie (shelf-life) du lait réfrigéré par allongement de la phase de latence (courbe de croissance bactérienne) en le supplémentant par l'extrait hydroéthanolique de Thym à différentes concentrations et la diminution de la charge microbienne finale du lait. Les bactéries présentes dans le lait sont ensuite comptées sur plusieurs jours, avec une croissance bactérienne observée dans le lait avec l'addition d'extrait par rapport au lait témoin (sans addition).

Dans cette étude, différentes étapes ont été mises en œuvre pour atteindre les objectifs :

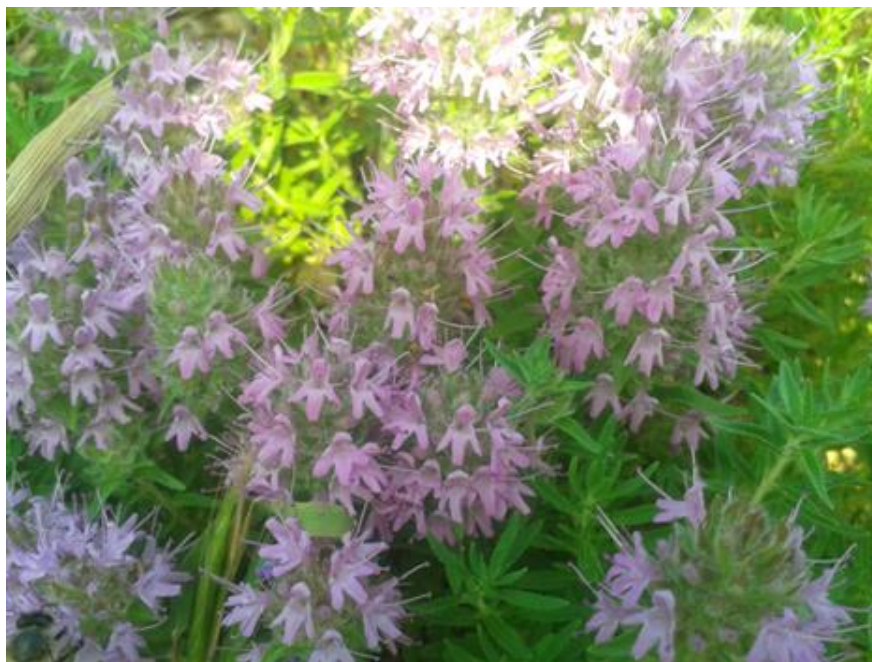
- La collecte du lait cru et de matière végétale de la région de Mila.
- La Préparation de l'extrait hydroéthanolique du Thym.
- L'addition d'extrait au lait cru à différentes concentrations.
- Suivie de la cinétique de croissance microbienne.
- Calcul des paramètres cinétiques de croissance.

Ce travail a débuté en 26 janvier 2022. L'expérimentation a été menée au niveau du laboratoire de la Faculté des sciences de la nature et de la vie du Centre universitaire Abdelhafid Boussouf à Mila.

## 1. Matériel végétal

### 1.1. *Thymus numidicus* Poiret

La cueillette de cette espèce a été effectuée durant le mois de mai 2020 (début de la floraison) de la même année, dans la région de Grarem Gouga Wilaya de Mila Nord Est de l'Algérie (36°30'14,51" N Lat., 6°24'45,41" E Long. et 315 m d'altitude), zone subhumide. Les parties aériennes ont été utilisées ensemble (**figure 06**).



**Figure 06 :** Représentation photographique de l'espèce *T. numidicus*

## 1.2. Préparation de matériel végétal

### 1.2.1. Séchage

La partie aérienne du Thym est dépoussiérée et séchée à l'ombre sur du papier propre à l'air libre, non exposée à l'humidité, sans recourir à un traitement thermique pour réduire la perte de composants actifs. Ils sont ensuite stockés dans des sacs en papier propres jusqu'à leur utilisation.



**Figure 07 :** La partie arienne de *Thymus numidicus* Poiret.

### 1.2.2. Broyage

À l'aide d'un Moulin à Café Électrique, la partie aérienne du Thym sec est broyée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, qui est conditionnée dans un bocal en verre propre et sec.



**Figure 08 :** Poudre de *Thymus numidicus*.

### 1.2.3. Préparation de l'extrait hydroéthanolique de *Thymus*

Dans ce travail nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques totaux. C'est une extraction solide-liquide le principe consiste à dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur en utilisant un solvant (Macheix *et al.*, 2005). On a utilisé l'éthanol comme solvant.

- 100 g de poudre végétale de *T. numidicus* a été extrait avec 500 ml d'un mélange eau/éthanol (50 :50) pendant 72 heures.
- L'extrait obtenu a été filtré 02 fois en utilisant le papier filtre standard.
- Le filtrat est concentré sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor (63°C /1h), afin d'éliminer tout trace de l'éthanol, le concentré est mis à l'étuve à 40 °C dans des boîtes de Pétri jusqu'à évaporation totale (15 jours).
- L'extrait sec a été gratté avec une spatule suivie d'un léger broyage manuel avec un mortier pour obtenir une poudre très fine.
- L'extrait obtenu est pesé et stocké dans un petit bocal en verre bien ombragé et fermé hermétiquement jusqu'à son utilisation.

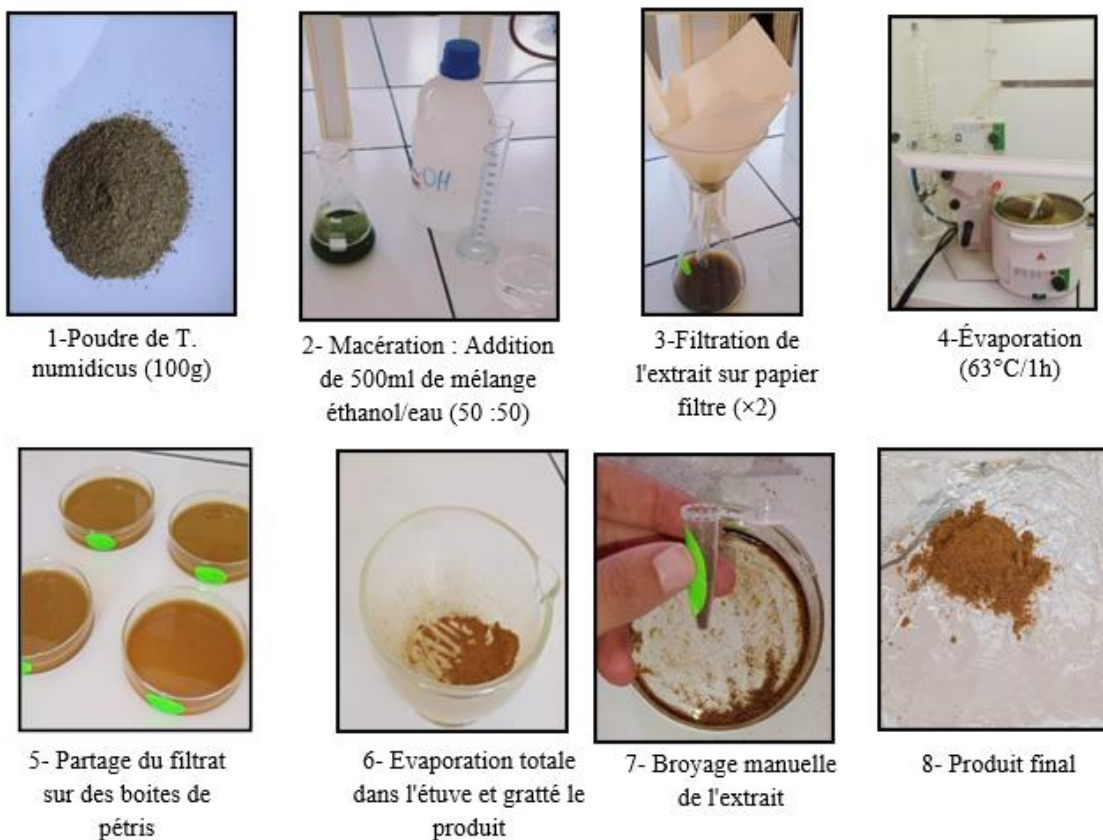
- Le rendement obtenu à partir de 100 g de poudre pulvérisée dans 500 ml d'éthanol à 50% est calculer selon la loi :  $Rd = M'/M \cdot 100$

**Rd** : Rendement exprimé en %

**M'** : Masse en grammes de l'extrait sec résultats en gramme (g).

**M** : Masse de la matière végétale à traiter en gramme (g).

- Les étapes de préparation de l'extrait hydroéthanolique sont les suivantes :



**Figure 09** : Protocole de préparation de l'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus*.

#### 1.2.4. Préparation de solution mère de l'extrait hydroéthanolique

Peser 1.5g de la poudre de l'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus* sec sur la balance de précision et ajouter 15 mL de l'eau distillé stérile dans un erlenmeyer stérile, puis utiliser la plaque agitatrice pour homogénéiser le mélange (fermer l'erlenmeyer par le papier aluminium).





**Figure 10** : solution mère de l'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus*.

Selon l'étude bibliographique (Chapitre I) des concentrations inhibitrices minimales (CMI), on prend la concentration 10mg/ml comme concentration de solution mère qui correspond la proportion 100%, on calcule les volumes de l'extrait ajoutés au lait comme suivant :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10\text{mg/ml} \times 100\text{ml} = 1.5\text{g}/15\text{ml} \times V_2$$

$$V_2 = 10 \times 100 \times 15 / 1500$$

$$V_2 = 10\text{ml} \longrightarrow 100\%$$

Pour le  $V_1$  qui correspond à :  $V_1 = 5\text{ml} \longrightarrow 50\%$

Les valeurs de l'extrait hydroéthanolique (EET) de *T. numidicus* ont été ajoutés au lait sont résumé dans **le tableau 10**.

**Tableau 10** : Concentrations, pourcentages et volumes ajoutés au lait.

| La concentration d'EET (mg /mL) | Le volume de SM (mL) | Le volume de lait (mL) | Pourcentage (%) |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| $C_1 = 5$                       | 5                    | 95                     | 50              |
| $C_2 = 10$                      | 10                   | 90                     | 100             |

## 2. Échantillonnage du lait

### 2.1. Site de prélèvement

Les échantillons de lait cru ont été prélevés dans une ferme située dans la localité d'Aïn Boudoua à Bouhatem dans la région de Mila Nord Est de l'Algérie (36°17'16" N Lat., 6°05'07" E Long. et 911 m d'altitude), au climat modérément froid.



**Figure 11** : Site de prélèvement

- **Description du site d'élevage**

|                  |                        |
|------------------|------------------------|
| Aération         | 6 fenêtres et 2 portes |
| Eclairage        | Présent                |
| Revêtement       | Présent (chaux)        |
| Etat de propreté | Très propre            |

- **Les Vaches laitières**

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| Race          | Bovine laitière                 |
| Nombre totale | 10                              |
| Origine       | Française Pie rouge             |
| Type          | Des vaches productrices de lait |

- **La Vache d'étude**

|               |        |
|---------------|--------|
| Age           | 03 ans |
| Etat de santé | Saine  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| Origine             | Pie rouge   |
| Fréquence de traire | 2 fois par jour matin et soir   |
| Quantité de lait    | 14 litres par jour  |
| Alimentation        | Interne :<br>Le son<br>L'orge<br>L'avoine<br>Le foin<br>Externe :<br>Hibiscus<br>Herbes |

## 2.2. Prélèvement

Les prélèvements ont été collectés dans un flacon stérile de 1L d'une façon aseptique au moment de l'échantillonnage ; les extrémités des trayons ont été nettoyées, les 3 premiers jets ont été éliminés et les échantillons de lait cru ont été prélevés des quatre mamelles dans un flacon puis acheminés immédiatement dans une glacière vers le laboratoire de la Faculté des sciences, centre universitaire-Mila. Dès leur arrivée au laboratoire les échantillons ont fait l'objet d'une série d'analyses microbiologique et physico-chimiques (**figure 12**).



**Figure 12** : Prélèvement du lait cru (Le : 29.03.2022).

### 3. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 3.1. Préparation du milieu de culture

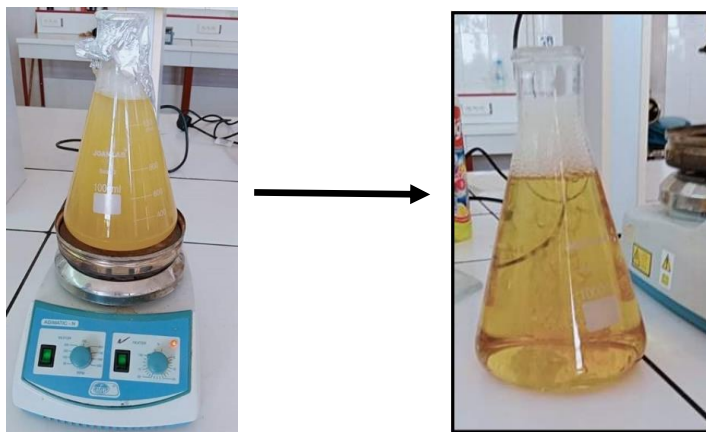
##### Gélose nutritive

Un milieu de culture dans la masse riche en éléments nutritive utilisé pour les micro-organismes peu exigeants, il est impliqué dans plusieurs méthodes d'analyses (comme les laitages).

1-D'après la fiche technique de la boîte de gélose, la concentration pondérale est de 23 g/L. Peser 23g de la poudre.

2-Dissoudre la poudre dans un litre d'eau distillée sur une plaque chauffante agitatrice.

3-Verser le milieu dans des flacons en verre et le stériliser immédiatement en autoclave pendant 10 min à 121 °C (**figure 13**).



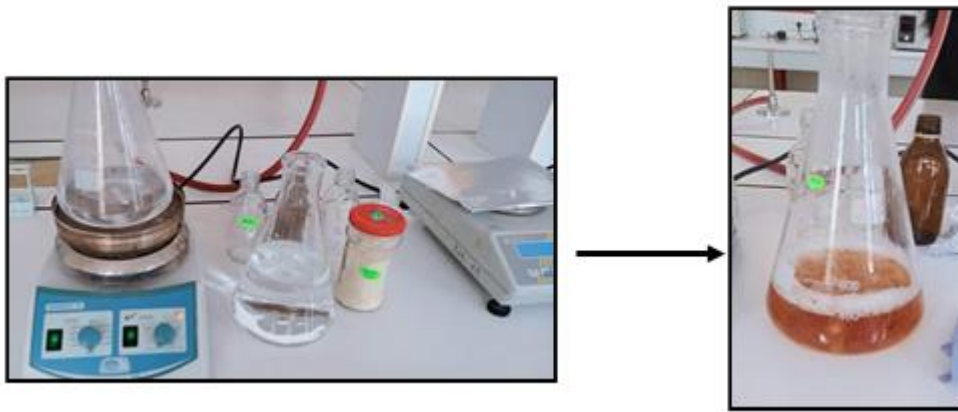
**Figure 13** : Préparation de milieu de culture gélose nutritive

##### Gélose MRS

Acronyme de microbiologie pour Man Rogosa et Sharpe Agar, un intermédiaire pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques.

1-la préparation de ce milieu est par dissoudre une masse de 68.3g de poudre de MRS dans un litre de l'eau distillée et en chauffant le mélange sous agitation.

2- Répartir le milieu dans des flacons puis les stériliser en autoclave (**figure14**).



**Figure 14 :** Préparation du gélose MRS

### **Gélose Chapman**

Gélose mannitol-sel, milieu sélectif pour la culture en surface et l'isolement de *Staphylococcus aureus*.

- Pour préparer, on prend 111 grammes de poudre, on dissout dans 1 litre d'eau distillée puis on stérilise les flacons du milieu dans un autoclave.

### **Gélose Heckteon**

Milieu différentiel moyennement sélectif pour l'isolement et la culture en surface de souches bactériennes d'*Entérobactéries* (*Salmonella*, *Shigella*...).

-76,67 g de poudre d'agar sont mis en suspension dans 1 litre de l'eau distillée et la solution est portée à ébullition jusqu'à dissolution des composants puis versée dans des flacons pour stérilisation en autoclave.

### **3.2. Eau physiologique**

-Pour préparer l'eau physiologique, dissoudre 9 g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée stérile. Puis dans un autoclave stériliser l'eau physiologique.

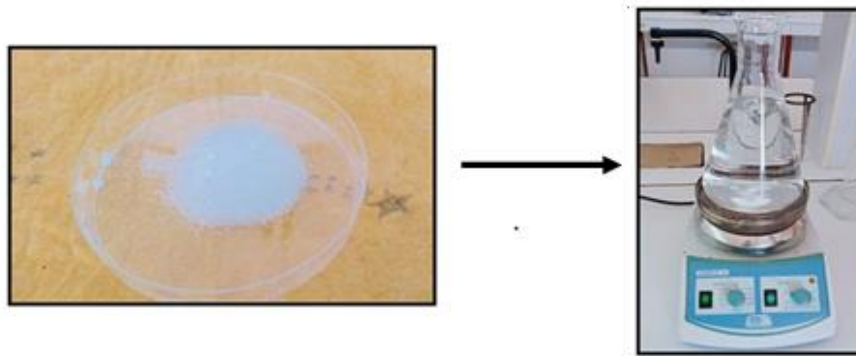
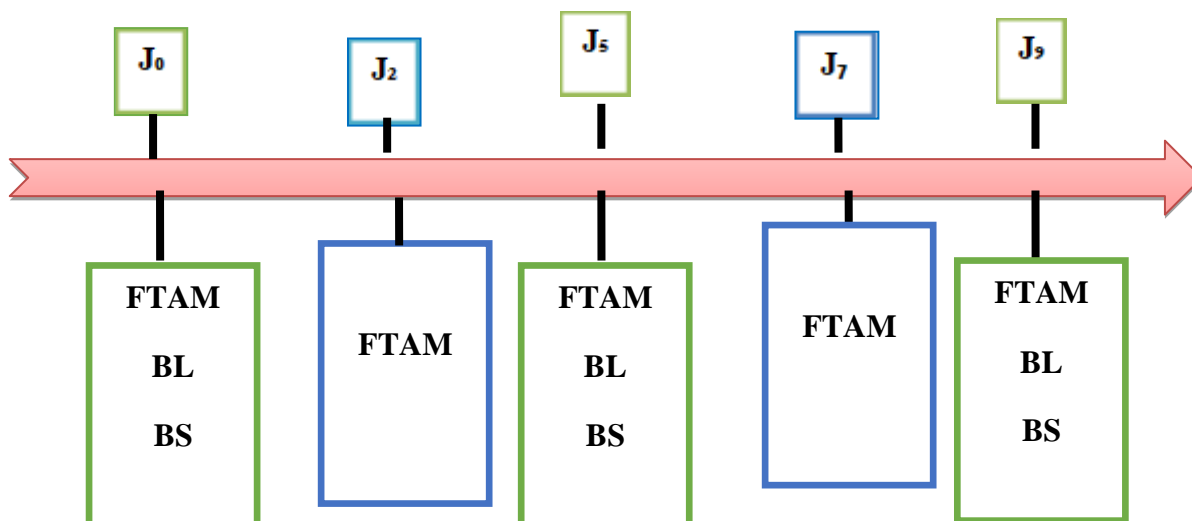


Figure 15 : Préparation de l'eau physiologique.

#### 4. Suivre de la cinétique de croissance bactérienne



**FTAM** : Flore Totale Aérobie Mésophile

**BL** : Bactérie Lactique

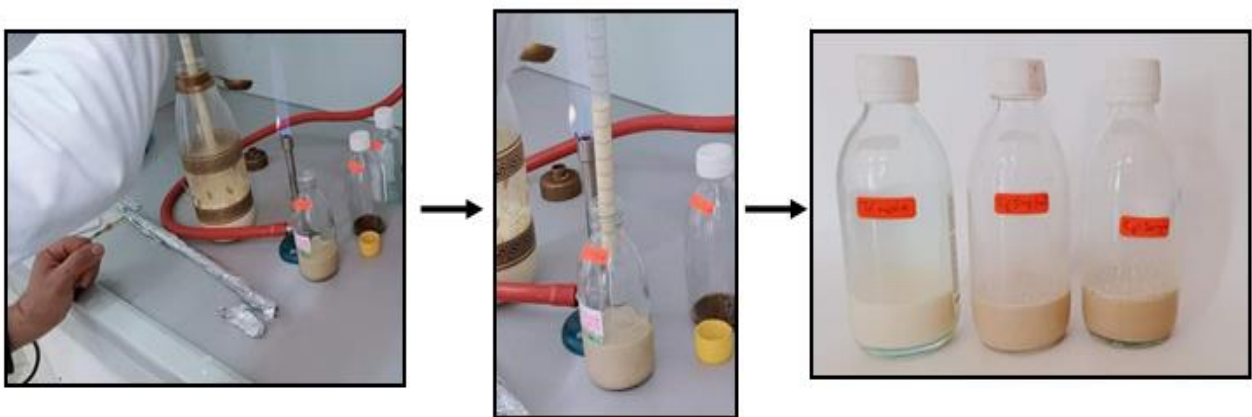
**BS** : Bactérie Spécifique

Le 29 mars 2022 est le premier jour des travaux expérimentaux de traitement de lait cru, le but de l'expérience est de suivre la croissance bactérienne de flore totale de lait supplémentées en E Et de *T. numidicus* et de les stocker à 4°C à intervalles réguliers : 0-2- 5-7-9 jours, l'expérience a été menée dans des conditions hautement stériles sous une hotte avec un Bec benzène.

#### 4.1. Ajout de l'extrait hydroéthanolique au lait

Sur le vortex, bien agiter le flacon mère du lait cru puis répartir 100 mL, 95 mL et 90 mL dans 03 flacons stériles identifiés, respectivement :  $C_1= 5\text{mg/mL}$  et  $C_2=10\text{mg/mL}$  et un Témoin de *T. numidicus*. Passer le col de chaque flacon à travers la flamme bleu de Bec benzène avant et après l'ajout de lait, les échantillons sont ensuite conservés à de  $4^\circ\text{C}$  pendant 10 jours.

Les volumes de l'extrait hydroéthanolique 10 mL et 5 mL sont ajoutés par pipette graduée stériles pour obtenir les dilutions 100%, 50 % respectivement (**figure 16**).

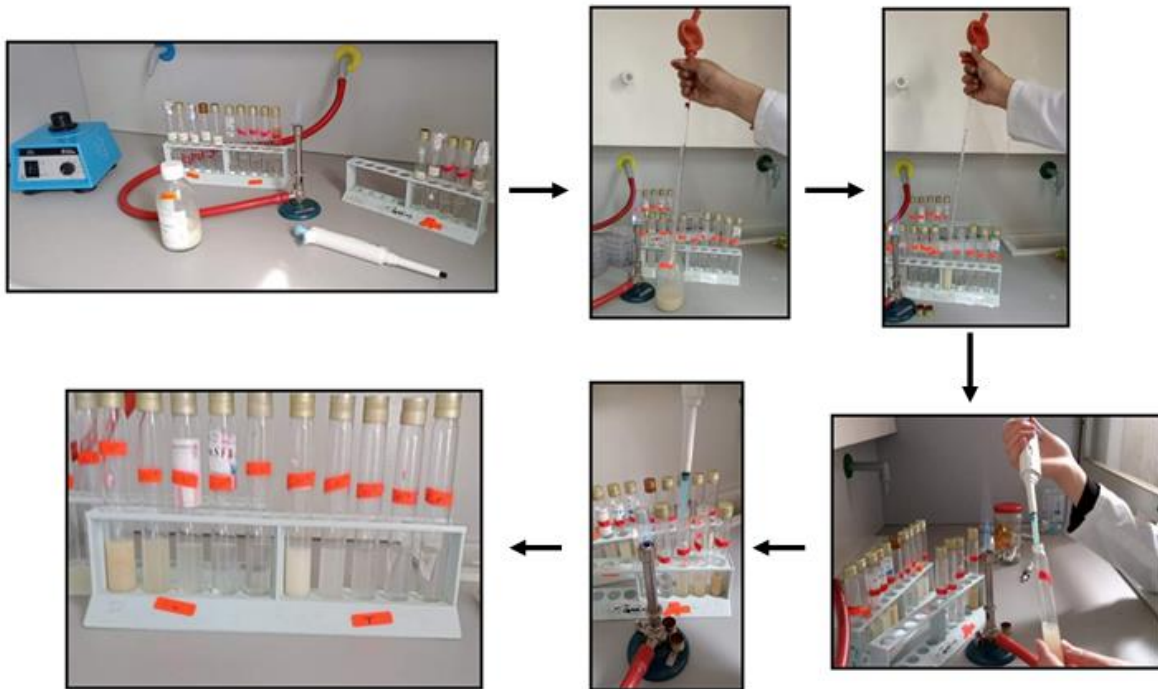


**Figure 16** : Ajout de l'extrait hydroéthanolique au lait.

#### 4.2. Préparation des dilutions décimales

Après agitation des flacons on prélève à l'aide d'une micropipette avec l'embout stérile 1ml du lait que l'on ajoute à 9 mL de l'eau physiologique contenu dans un tube à essai. Puis on agite sur vortex puis on procède à des dilutions successives jusqu' à  $10^{-5}$  (**figure 17**).





**Figure 17 :** Préparation des séries de dilutions.

### 4.3. Dénombrement de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)

#### 4.3.1. Principe

Le dénombrement a été réalisé sur gélose nutritive. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre l'évolution. Le nombre des germes « totaux » pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de l'état de décomposition du produit.

#### 4.3.2. Mode opératoire

Préparer et identifier une série de répétitions de 02 boîtes de Pétri pour chaque série de dilution c'est-à-dire 10 boîtes au total, coder soigneusement et clairement les boîtes pour chaque dilution.

Ensemencer des boîtes par 1 mL de chaque dilution ( $10^{-1}$  jusqu' à  $10^{-5}$ ). Ajouter 15 à 20 mL de milieu de gélose nutritive.

Le mélange est homogénéisé par des mouvements circulaires.

Après solidification, les boîtes sont retournées puis incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures, après cette durée, on dénombre les colonies lenticulaires



#### 4.4. Dénombrement des microorganismes psychotrophes

##### 4.4.1. Principe

Afin de quantifier cette population, le dénombrement des germes a été réalisé sur :

Gélose RMS pour les bactéries lactique

Gélose Chapman pour *staphylococcus*

Gélose Hektoen pour *entérobactéries*

##### 4.4.2. Mode opératoire

###### Bactéries lactiques

-Préparer et identifier une série de 02 boites de Pétri seulement pour la dilution  $10^{-1}$  de chaque concentration, c'est-à-dire 06 boites au total, coder soigneusement et clairement les boites.

-Prélever 0,1 mL de la dilution  $10^{-1}$  et déposer au centre de la boite, ensuite couler tendrement la 1<sup>ère</sup> couche de gélose en masse, attendre quelques minutes puis couler la 2<sup>ème</sup> (ensemencement en double couches).

-Faire des mouvements doux en forme de 8 pour homogénéiser.

- Laisser refroidir à température ambiante pour solidifier et fixer l'inoculum (environ 10-15min)

-Incuber à l'étuve pendant 48 h à 37°C.

###### Bactéries spécifiques (BS)

-06 boite pour la gélose Chapman 02 pour la dilution  $10^{-1}$  pour chaque concentration 5mg/mL ,10mg/mL et le Témoin. Les mêmes actions pour la gélose Hektoen.

-Prélever 0,1 mL de la dilution de lait cru à l'aide d'une micropipette et déposer au centre puis étaler en surface avec râteau.

-Laisser refroidir à température ambiante pour solidifier et fixer l'inoculum (environ 15min).

-Incuber à l'étuve pendant 48 h à 37°C.

#### 4.5. Détermination du nombre UFC/mL

Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/mL en utilisant la formule suivante :

##### En cas d'une seule boite exploitable :

$C_n = (\text{nombre d'UFC comptées} / \text{Volume d'inoculum déposée}) \times \text{Facteur de dilution}$

##### En cas de deux boites exploitables :

$C_n = (\text{la somme de nombre d'UFC comptées} / 1,1 \times \text{Volume d'inoculum déposée}) \times \text{Facteur de dilution (le moins fort)}$

Avec intervalle des boîtes exploitables entre [30-300] .

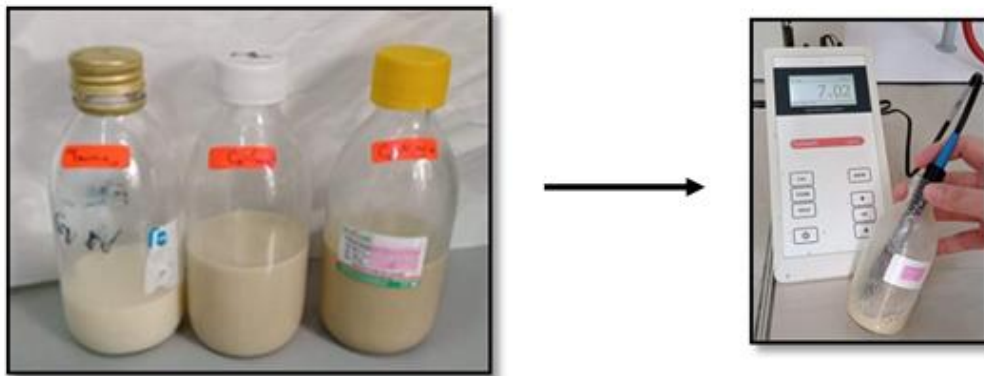
#### 4.6. Analyse statistique

Les résultats d'analyse des données statistiques obtenus dans ce travail ont été réalisés par :

- Logiciel « **Origin 2022b** » ;
- Site « **Combase** » par le « **modèle Baranyi et Roberts** » ;
- Logiciel tableur « **Excel** ».

#### 4.7. Suivi le pH

Le pH est obtenu à l'aide d'un pH mètre. La valeur est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans les flacons spéciaux de mesure du pH à chaque 48 h pendant 10 jours (**figure 18**).



**Figure 18** : Suivi du pH pendant 10 jours.

# **Chapitre IV**

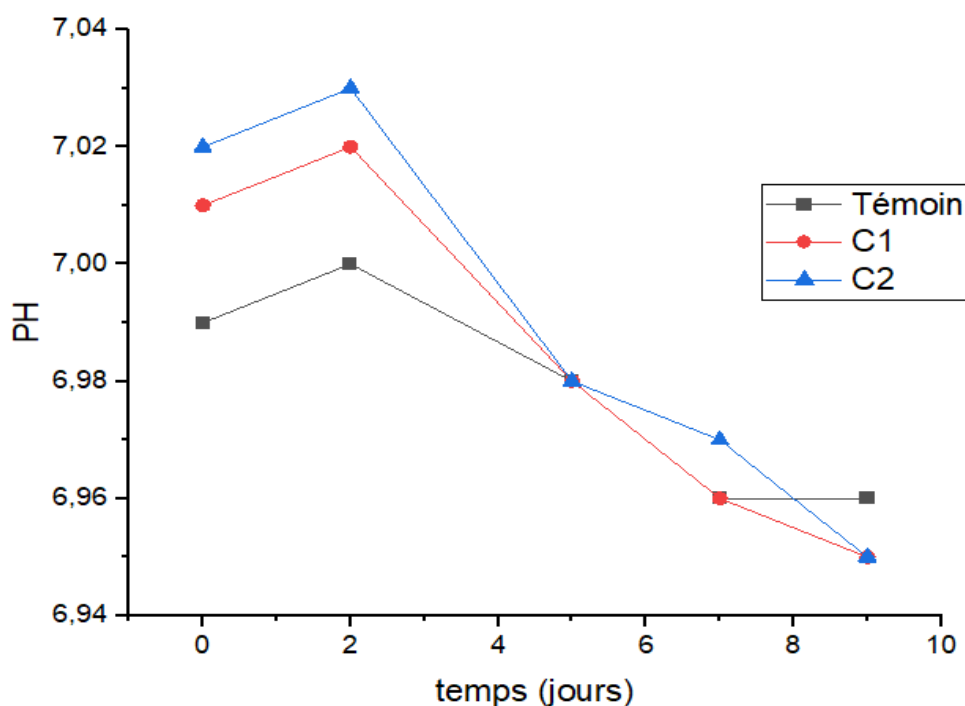
## **Résultats**

## 1. Aspect et rendement d'extraction

L'extrait obtenu par macération extraction hydroalcoolique (extraction hydroéthanolique) à partir des parties aériennes de *T.numidicus* est de couleur verdâtre foncé, non visqueux, très odorant, hydrophile et soluble dans les solvants organiques (éthanol). Le rendement obtenu de cette extraction est estimé à 8,71%.

## 2. Variation du pH

Les résultats du suivi de l'évolution du pH en fonction du temps, présentés à la **figure 19**. Ce dernier révèle que le pH est compris entre **6,96** et **7,03** ont montré que le pH du lait cru additionnée par l'EEt de *T.numidicus* à concentrations 5mg/mL ,10mg/mL et le Témoin présentait une augmentation du pH du  $j_0$  au  $j_2$ , puis une diminution le reste des jours de l'expérience (**Annexe 02**) .



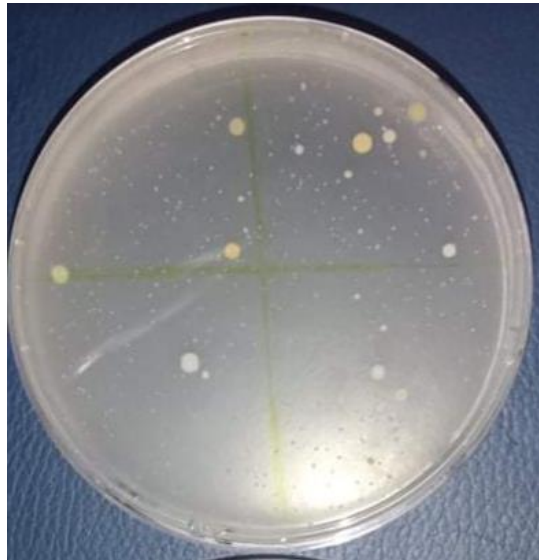
**Figure 19** : Suivi de l'évolution du pH au cours des jours de l'expérience.

### 3. Suivre la croissance bactérienne

Le suivi de la flore totale, les bactéries spécifiques (bactéries lactiques, *staphylococcus* et *entérobactéries*) et le pH du lait cru après conservation à 4°C dans le réfrigérateur et après traitement avec différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique de *T.numidicus* pendant 10 jours à montrés les résultats suivantes :

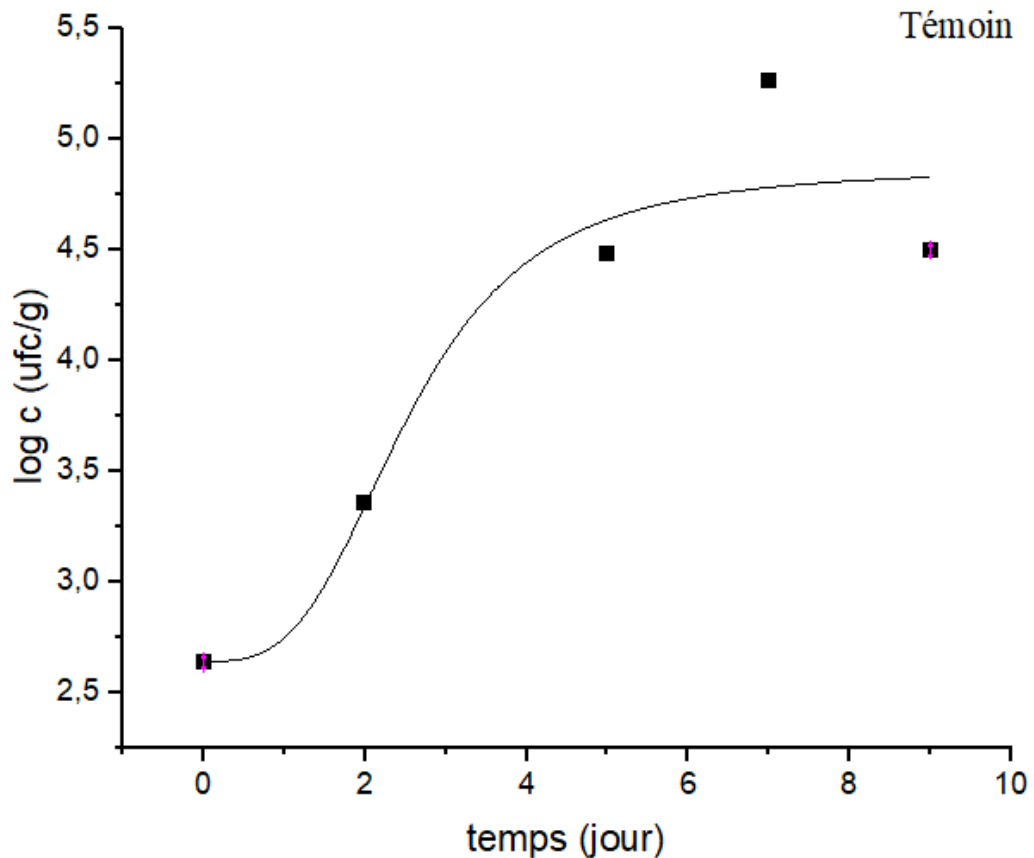
#### 3.1. Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)

Nous avons constaté que tous les échantillons de lait cru analysés donnent des cultures bactériennes positives sur la gélose nutritive ; et des caractéristiques phénotypiques suivantes : un groupe de colonies de tailles différentes (grande, moyenne, petite), de couleurs différentes (blanche et jaune) et de forme ronde régulière ou irrégulière ; certaines en surface et d'autres ancrées dans de la gélose sous forme de lentilles (**figure 20**).



**Figure 20** : Flore totale sur gélose nutritive.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 21** ont montré que dans le lait cru non traité (Témoin) le nombre de la flore aérobie totale mésophile a augmenté entre les jours [0-7] puis a diminué progressivement le reste des jours de l'expérience.

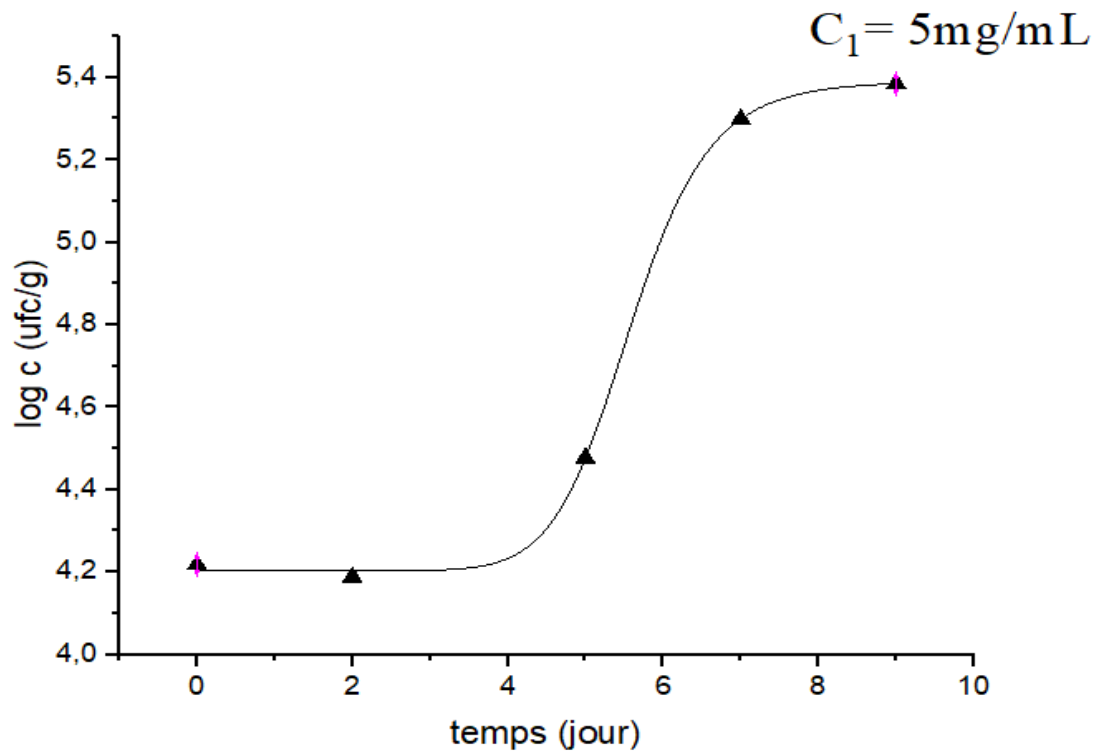


**Figure 21** : L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C non additionné (Témoin).

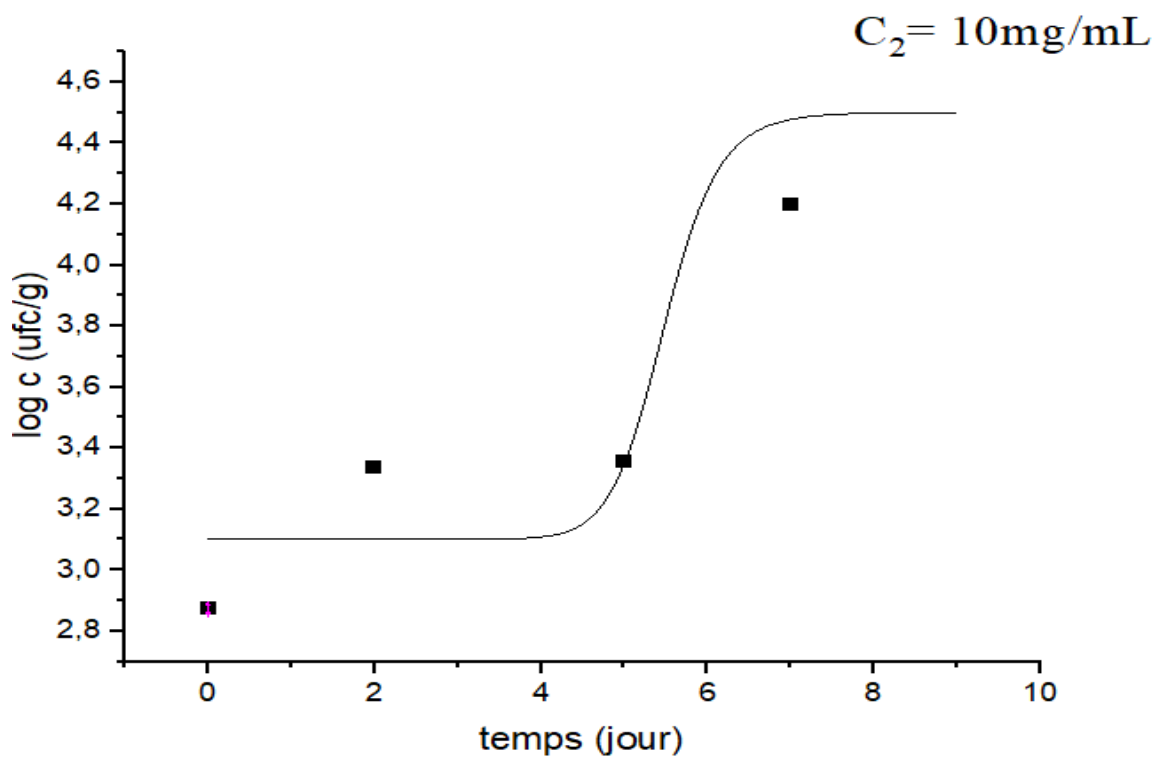
Cependant le lait traité avec l'extrait hydroéthanolique de *T.numidicus* à concentration  $C_1=5\text{mg/mL}$  et  $C_2=10\text{mg/mL}$  à révèlè que le nombre de la flore aérobie totale mésophile est évaluée comme suit :

$C_1= 5\text{mg/mL}$  : il y a une augmentation continue tout au long des jours de l'expérience (**figure22**).

$C_2= 10\text{mg/mL}$  : il y a une augmentation entre les jours [0-5] suivie par une diminué progressive (**figure 23**).



**Figure 22 :** L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de *T.numidicus* à 5mg/mL.



**Figure 23 :** L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de *T.numidicus* à 10 mg/mL.

### 3.2. Détermination des paramètres cinétiques de la croissance bactérienne

**Tableau 11** : Les valeurs des paramètres de croissance bactériennes de la flore totale de lait (obtenu par Modèle Baranyi et Roberts de données de comptage moyen de bactéries viables totales).

| % EEt | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | $\mu_{\max}$ | G     |
|-------|------------|------------|--------------|-------|
| 0     | 2.642      | 4.863      | 0.424        | 0.397 |
| 50    | 4.194      | 5.000      | 0.228        | 3.239 |
| 100   | 2.870      | 3.757      | 0.281        | 3.558 |

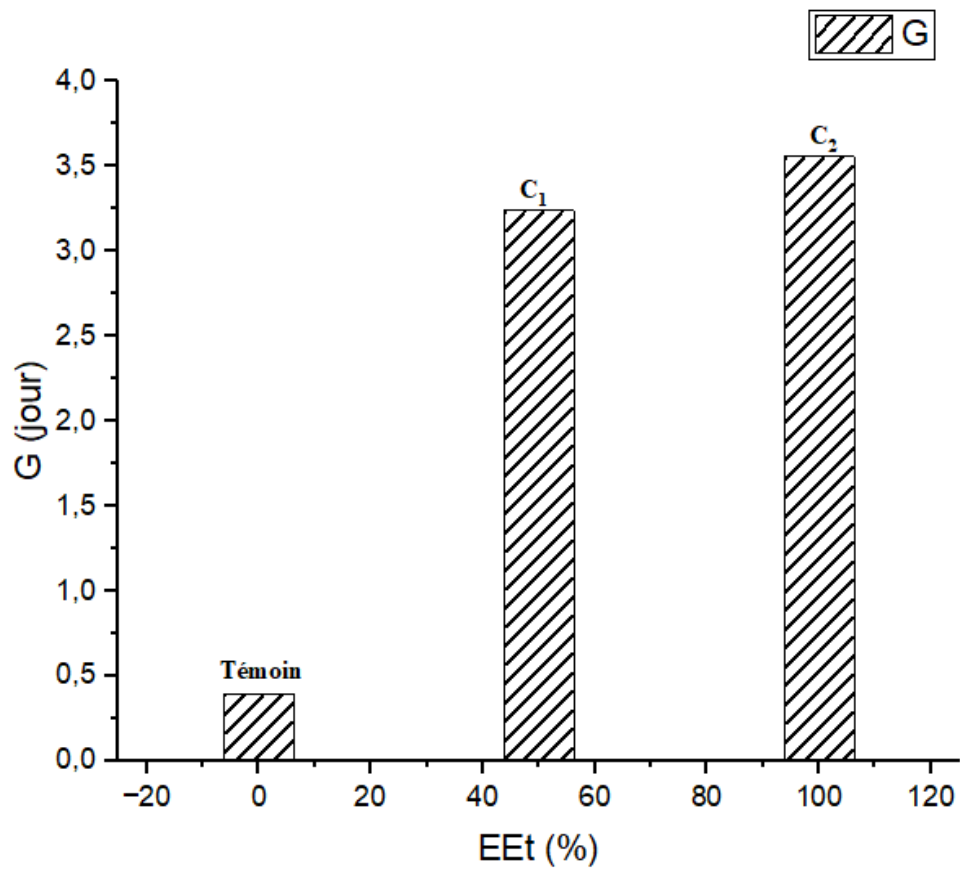
$X_{\max}$  : Niveau maximal de croissance (Log UFC.mL<sup>-1</sup>)

$\mu_{\max}$ : Vitesse maximale de croissance ( $\Delta$  Log UFC.mL<sup>-1</sup>/jour)

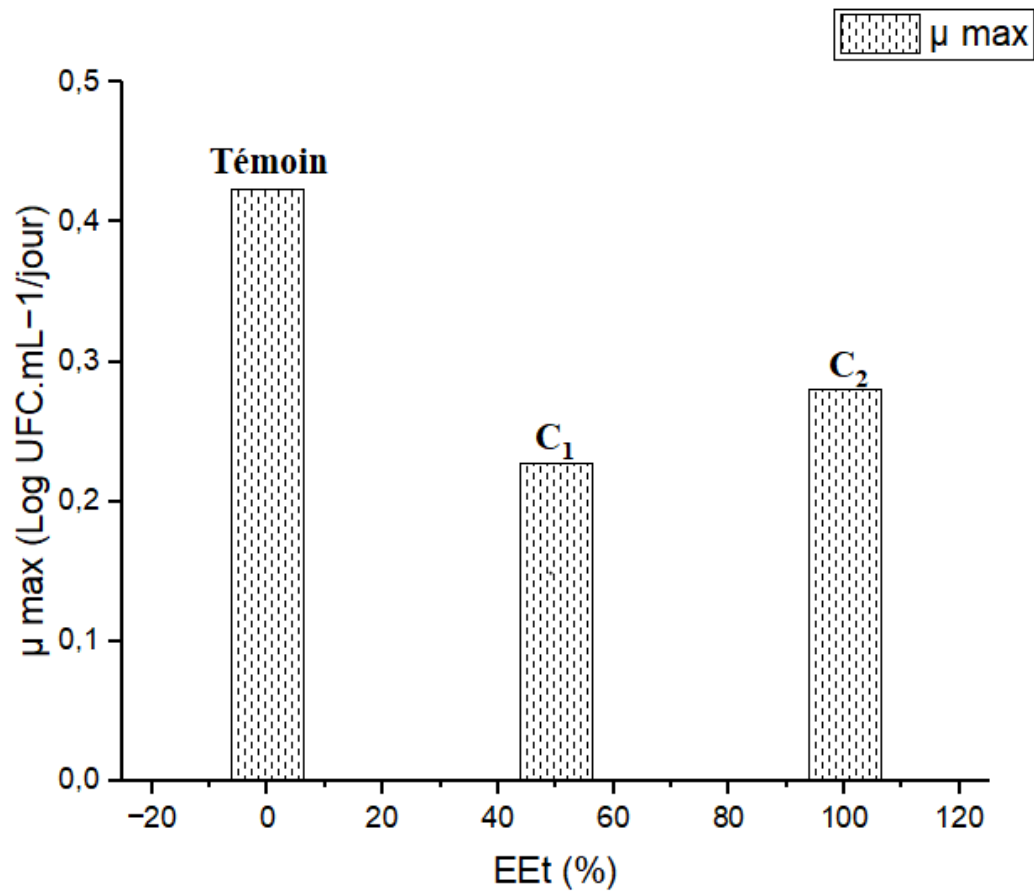
G : Temps de génération (Jours) =  $1/\mu_{\max}$

Les résultats des paramètres cinétiques de croissance sont transformés en histogrammes **Figure 24,25,26**.

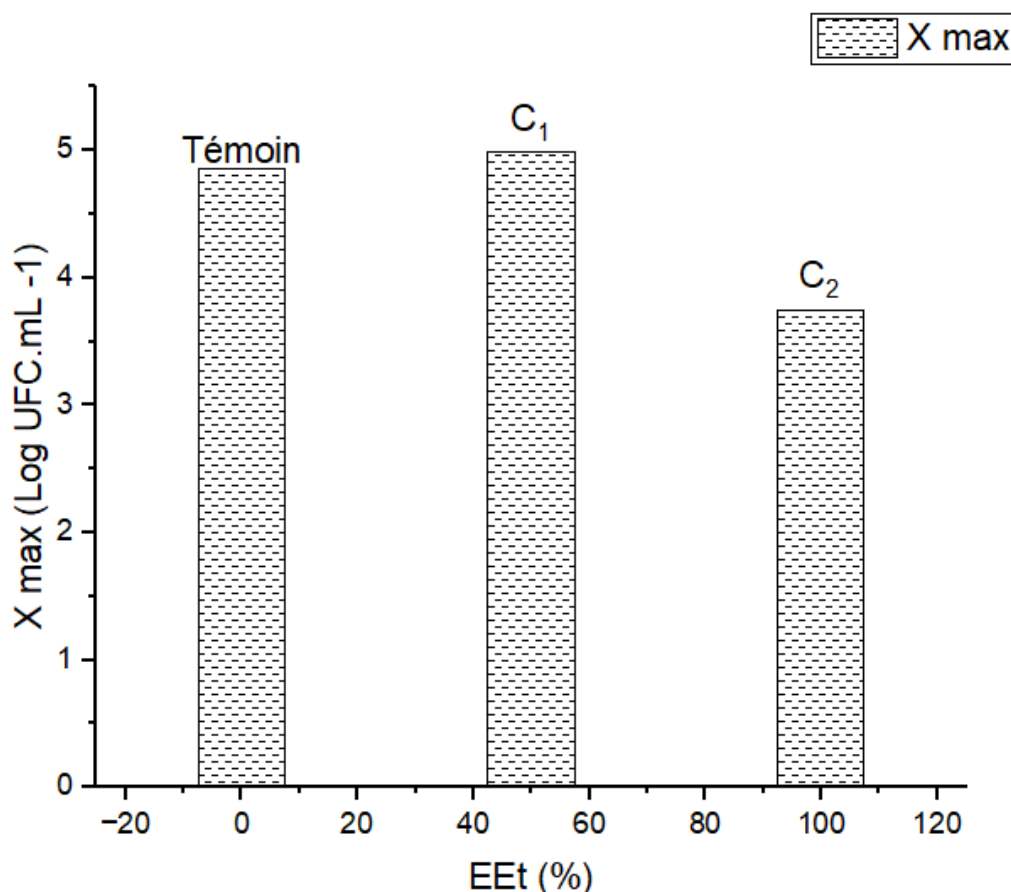




**Figure 24 :** Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru réfrigérer à 4°C sur le temps de génération (G) par rapport au témoin.



**Figure 25 :** Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru réfrigérer à 4°C sur la vitesse maximale de croissance  $\mu_{\max}$  par rapport au témoin.

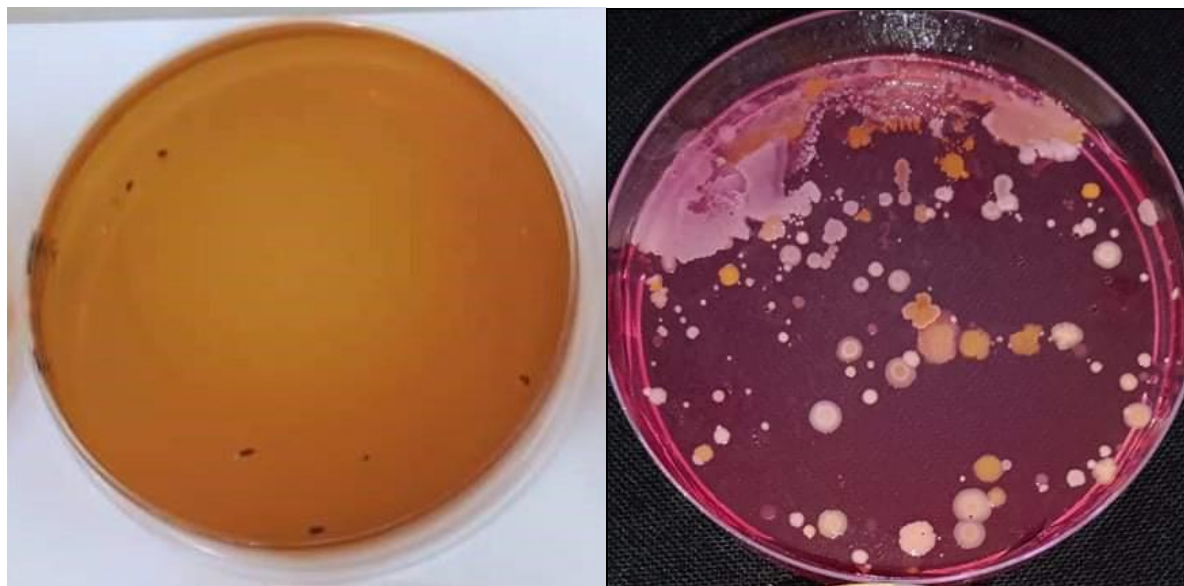


**Figure 26 :** Effet de l'ajoute d'extrait hydroéthanolique au lait cru réfrigéré à 4°C sur le Niveau maximal de croissance  $X_{\max}$  par rapport au témoin

La concentration 10 mg/mL de l'extrait hydroéthanolique (EEt) a donné le temps de génération le plus long ( $G=3.55$ ) avec une croissance maximale la plus faible ( $X_{\max} = 3.75$  Log UFC. mL<sup>-1</sup>) par rapport au témoin ( $G= 0.397$ ) et ( $X_{\max} = 4.863$  Log UFC. mL<sup>-1</sup>) et à la concentration 5mg/mL ( $G= 3.23$ ) et ( $X_{\max} = 5,00$  Log UFC. mL<sup>-1</sup>). Par conséquent, la durée de conservation du lait a été significativement améliorée en ajoutant l'extrait hydroéthanolique (EEt) à concentration 10mg/mL par rapport à l'EEt à concentration de 5mg/mL et au témoin.

### 3.3. Flore spécifique

L'ensemble des caractéristiques phénotypiques de la flore spécifique sont des colonies de taille différentes, de forme ronde et de couleur Blanchâtre et jaunâtre (**figure 27**).



**Figure 27** : flore spécifique : *lactobacillus* (à gauche) *Staphylococcus* (à droite).

# **Chapitre V**

## **Discussion**

## Discussion

Dans notre travail, le rendement obtenu à partir de l'extraction par macération à froide avec de l'éthanol des parties aériennes de *Thymus numidicus* est considérable par rapport à celui de d'extrait hydroéthanolique du même genre, (*T. algeriensis*) récolter dans la région semi-aride de Bachar sud -ouest de l'Algérie au Mai et Juin est (7.26%) (Messaoudi *et al.*, 2019) ; Au Maroc, corrélativement à une étude antérieure faite de Labiad *et al.*, 2017 sur *Thymus satureioides* notre rendement est supérieur aux leurs obtenue (5.35%). Les résultats du rendement de l'extrait hydroéthanolique sont inférieure à celles obtenue par Taghouti *et al.*, 2020 à partir d'extrait de *T. mastichina* avec un rendement de (13.78%), et du Silva *et al.*, 2020 à partir d'extrait de *T. zygis subsp. zygis* avec un rendement de (22.83%). Ces différences peuvent être dues au climat spécifique des régions, à l'origine des échantillons, à des facteurs géographiques, au type de sol et à la saison de cueillette. Les résultats du rendement de l'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus* est considérable par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source de ce type d'extrait ; il est plus élevé que celui de *Hyptis suaveolens* (8%) et de *Propolis* (7.26 %) (Medoatinsa *et al.*, 2015 ; Lanez *et al.*, 2014). C'est très encourageant pour l'utilisation de l'extrait hydroéthanolique de *Thymus numidicus* comme agent antimicrobien naturel et dans la bioconservation des aliments.

Le pH est un bon indicateur sur l'état de la fraîcheur du lait (Elhadj *et al.*, 2015). Le pH d'un lait frais se situe entre 6,6- 6,8 (Lapointe-Vignola., 2002). Cependant le pH du lait analysé est majoritairement supérieur à 6,8. Ces valeurs élevées peuvent être justifiées par l'état sanitaire de vache, les vaches atteintes de mammite produisent généralement un lait alcalin au goût salé plus sujet à la lipolyse et à la protéolyse (Maïworé *et al.*, 2018), aux conditions hygiéniques de la traite (Bonfon *et al.*, 2006), ou au le manque de système de réfrigération pendant le transport. Les valeurs de pH obtenus au cours de cette étude sont largement au-dessus de ceux obtenus par Shaban *et al.*, 2021 qui ont utilisé la Propolis ; De plus, la diminution du pH a été plus lente (à partir du deuxième jour) par rapport à la même étude (à partir du premier jour). Peut-être que cette diminution des valeurs de pH contribue à renforcer de l'activité antibactérienne de l'extrait de plante. Selon Djenene et ses collaborateurs (2012) à pH plus bas, l'hydrophobicité de certaines molécules augmente et elles sont ainsi correctement réparties dans la phase lipidique du produit. Ces molécules peuvent également se dissoudre plus facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne et ainsi

renforcer leur action antimicrobienne. En nous référant à notre étude, nous avons observé que le lait avait un taux butyrique important.

Dans notre étude, les résultats d'analyses microbiologiques ont montré que l'extrait hydroéthanolique de *Thymus numidicus* a un effet antibactérien très marqué ; Cela confirme une étude précédente de **Messoudie et al** en **2019** sur des extraits hydroalcooliques de *Thymus algeriensis*, les extraits testés ont montré un potentiel antibactérien, en particulier contre les germes hautement pathogènes, l'extrait méthanolique et éthanolique de *T.algeriensis* interagissent contre les souches *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.coli*, *P.aeruginos* et *S.typhimurium* avec des petites quantités [40-65ug/mL] pour les bactéries gram+ et [80ug/mL et 270ug/mL] pour les bactéries gram-, l'augmentation remarquable de concentration est due à la structure rigide des parois bactériennes de ces derniers (**Messaoudi et al., 2019**). Par comparaison avec l'extrait méthanolique de *T. Vulgaris* qui donne un effet anti bactérien contre les mêmes souches pour des concentrations très faibles CMI=15,8ug/mL pour *S.aureus* dans un intervalle de [250- >500ug/mL] pour *E.coli*, *E.faecalis*, *P.aeruginos*, *S.typhimurium* et 31,2ug/mL contre les *bacillus* (**Al-Bayati, 2007**). Cependant, *T.numidicus* a une action inhibitrice avec une CMI = 10mg/mL pour les bactéries Gram+ et Gram-, quand on a été utilisé tant que extraits éthanolique et aqueux à supériorité de l'extrait aqueux qui avait une CMI de 2.5mg/mL contre *E.faecalis* (**Zeghib, 2013**).L'extraction par solvants organiques (Butanol, méthanol, chloroforme, acétate d'éthyle) de *T.numidicus* ont montré une forte activité contre *Echerichia coli*, *Pseudomonas fluorescence*, *Staphylococcus aureus*, ainsi les extraits de *T.numidicus* inhibent la croissance des bactéries gram+ à l'extrait de concentration de 25% alors que pour les bactéries de Gram- elle est limitée à l'extrait de concentration de 50% (**Behidj-Benyounes et al., 2017**). L'extrait éthanolique de *Thymus numidicus* a un potentiel d'activité antibactérienne plus puissant que l'extrait butanolique testé par **Ait kaki et ses collaborateurs (2021)**. Ceci confirme une précédente étude de **Mamadou et al., 2014** la richesse en flavonoïdes de l'extrait éthanolique explique mieux son activité antibactérienne.

Les composants phénoliques présents dans cet extrait ont été reconnus par plusieurs auteurs pour leur activité antimicrobienne ; en **2007**, **Ulanawska et al** ont évalué les effets antibactériens des flavonoïdes (Apiginine, Narginine, Génistéine, Daidzein, Kaempférol) en estimant les temps de génération dans des cultures bactériennes liquides *in vitro* des souches bactériennes (*B. subtilis*, *M. luteus* et *Sarcina sp.* *S. aureus*, *C. freundii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. marcescens*, *V Harvey*), les résultats

obtenus ont montré de nettes différences dans la durée de temps de génération de ces souches. Ainsi **Zeghad et Merghem, (2013)** ont évalué l'activité antibactérienne des flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli*, les résultats pour les diamètres des zones d'inhibition montrent que *E. coli* et *Staphylococcus aureus* semblent être sensibles aux flavonoïdes testés (Quercetin, Kaempferol 3OR' 7OR'', Luteolin 7OR', Luteolin, Quercetin 3OR' 7OR'', Chrysin 7OR', Apigenin 5OR' 7OR''), de plus, ils ont trouvé que les flavonoïdes dépourvus de groupements hydroxyles libres (ex : Apiginine 5OR'7OR et Intéoline 7OR') ont l'activité la plus antimicrobienne de celles qui en sont remplis, ce qui conduit à une affinité chimique accrue pour les lipides membranaires ; Ainsi, on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique des bactéries. Les acides phénoliques ont également une activité antibactérienne qui a été prouvée par de nombreuses études ; l'acide caféique a montré une activité antibactérienne modérée (ZI = 9,8 mM - 10,4 mM) contre *Bacillus cereus*, *E. coli* et *S. Enteritidis* dans une étude réalisée en **2011** par **DJenane et al** où l'extrait de feuille d'olivier a été utilisé comme bioconservateur dans la dinde fraîche. Il est possible que l'activité des composants majeurs soit modulée par d'autres molécules mineures. En fait, les effets synergiques des divers constituants majeurs et mineurs présents dans les extraits végétaux bruts doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique.

En comparant les valeurs des paramètres de croissance bactérienne mentionnées dans le **tableau 08** avec celles obtenues par **Bouchair et al., (2021)**, qui ont travaillé sur le lait réfrigéré à 4°C de deux fermes sans addition, la valeur de densité cellulaire maximale  $X_{max}$  du lait additionné d' EEt de *T.numidicus* est dans l'intervalle [3,75-5]log UFC /mL et est inférieur aux  $X_{max}$  de lait réfrigéré non additionné de montagne et de bassin da région de Mila qui ont été [6,29-7,00] log UFC /mL (**Bouchair et al .,2021**), et est inférieur aussi au lait réfrigéré à 4°C collecté à Biskra [5,25 log UFC/mL] (**Boubendir et al.,2016**). Le temps de génération G obtenu dans notre étude est moyenne et est entre [3,23–3,55] par jour, par rapport à celui de **Bouchair et al., (2021)** qui est entre [1,20-4,18] jours. Le lait réfrigéré a été collecté à région de Victoria Australie a le temps de génération approximé de trois jours (**Vithanage et al., 2017**), qu'ils sont inférieurs ou proches aux celui obtenu dans cette étude. Une diminution significative de la vitesse maximale qui est entre [0,218-0,281] Log UFC.mL<sup>-1</sup>/jour pour notre lait additionné l'EEt de *T. numidicus* ; quand celle de lait réfrigéré a une vitesse maximale entre [0,78-0,73] Log UFC.mL<sup>-1</sup>/jour (**Bouchair et al., 2021**).

D'après **Bouchair et leurs collaborateurs 2021** ; la région où l'animal a été domestiqué, le temps de stockage et la température de refroidissement de lait sont influencés la qualité



microbiologique de lait. La charge microbienne de lait des bassins a une concentration bactérienne initiale supérieure à celle des montagnes, la première était  $3,87 \pm 0,11$  log UFC/mL et la deuxième était  $2,94 \pm 0,04$  log UFC/mL respectivement, dans notre étude, la densité cellulaire initiale de lait de Aïn Boudoua-Bouhatem qui a été réfrigéré à 4°C avec l'addition d'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus* est 4,19 log UFC /mL et 2,87 log UFC/mL des concentrations faible  $C_1=5$ mg/mL et forte  $C_2=10$ mg/mL respectivement. Ces valeurs sont très proches du fait de la proximité des zones où le lait a été collecté : influence des climats et de la nutrition qui sont similaires.

Parmi les techniques conventionnelles de conservation de lait sont la pasteurisation et le traitement UHT qu'ils sont incapables d'éviter la détérioration de celui plus de 4 jours par la résistance des bactéries psychrotrophes de lait par la production des métabolites antagonistes et des enzymes thermorésistants qui provoquent un changement remarquable de composition de lait par l'apparition des nouvelles espèces bactériennes et la dégradation des composés de lait par conséquent il est dépassé la valeur limitant des bactéries psychrotrophes  $5 \times 10^4$  UFC/mL (log 4,69 UFC/mL) qui va à l'encontre des standards mondiaux de protection alimentaire hygiénique et sanitaire (**Cemprikova, 2002., Boubendir et al., 2016., Machado, 2017**). Des études récentes travaillent à trouver des nouvelles techniques de conservation alimentaires plus sûre et efficace à part le traitement thermique (réfrigération, pasteurisation et UHT) ; la congélation à l'aide de rinçage continu par le gaz N<sub>2</sub> prouve leur efficacité pour conserver le lait que le stockage à froid 6°C mais la flore bactérienne sera inhibée sans détruire qui pose la question de contenir des germes pathogènes qui sont capables de renaissance lorsqu'elles sont ramenées à des températures froides ou moyennes (**Gschwendtner., 2016**).

La conservation alimentaire par les produits naturels est un mécanisme moderne basé sur l'effet de ces substances en tant qu'antimicrobiens et antioxydants; Ils attaquent les membranes des cellules bactériennes cibles par la rupture et la perturbation structurale et fonctionnelle : désintégration de la force motrice du proton et l'épuisement énergétique (**Quinto et al., 2019**). De plus les additifs végétales ont toujours deux propriétés dans une seule molécule qu'ils sont l'effet antimicrobien et antioxydant, ça les met dans des composés encore plus économiques (**Quinto et al., 2019**). On peut mentionner comme un exemple : Thym qui possède une activité importante contre les *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Listeria monocytogene* et les *Pseudomonas*. Les applications de Thym sur l'anguille fumée sous forme poudre au bain de saumurage 1,5% puis réaliser le fumage réduisent la flore

mésophile aérobie totale et l'oxydation des graisses avec la ralentissement de formation d'azote basique totale volatil même si l'amélioration des propriétés organoleptiques (**Zeria et al., 2006 ; Quinto et al., 2019 ; Burt et al., 2004**) justifié le potentiel antimicrobien de Thym contre *E.coli* et *Listeria monocytogene* grâce à sa richesse en huiles essentiels (CMI=0,3-1,25µl/ml).ainsi une haute sensibilité des *Salmonella enteritidis* et *Salmonella paratyphi* présentent au surface de bœuf(**Martinez et al., 2020**) ; grâce à l'épîçage de viandes réfrigéré à 4°C avec la poudre ou l'extrait de Thym rend les *Bacillus spp* indétectables environ 18jour et la flore anaérobie totale reste sous la seuil bactérienne pathogénique (2,16-3,06 log UFC/ml) (**Jaworska et al., 2021**) l'utilisation de Thym en tant qu' un bio conservateur non seulement pour la viande de bœuf mais aussi pour le porc émincé (CMI des HE =0,8µl/g),les crevettes cuites(CMI=7,5-15µl/g),les poissons asiatiques(CMI=0,5µl) et appliqué aussi sur les végétaux tel que laitue romaine (CMI=0,1-10µl/ml) avec l'avantage de confère l'odeur d'herbes prononcé pendant la durée de stockage qui était plus de 30 jour à 0-2°C(**Burt et al., 2004**).

# **Conclusion**

## Conclusion

Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles et les extraits des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques.

Nous rappelons que l'objectif de notre étude est la prolongation de la durée de vie (shelf-life) du lait réfrigéré par l'allongement de la phase de latence de la courbe de croissance bactérienne par la supplémentation de l'extrait hydroéthanolique (50/50. v/v) de *Thymus numidicus*.

Les résultats de l'étude d'extraction ont montré que le rendement d'extraction résultant de la macération dans l'éthanol est considérable.

Concernant l'évaluation de la cinétique de croissance microbienne de lait aux concentrations 5mg/mL et 10mg/mL de l'extrait hydroéthanolique de *T. numidicus* par rapport au témoin, notre extrait a permis de prolonger la durée de vie (shelf-life) jusqu'à trois jours et quart ( $G=3,23$ ) à la concentration de 5 mg/mL avec une densité cellulaire maximale égal à 5 logUFC/mL et un taux de croissance le plus faible égal à 0,22 Log UFC.mL<sup>-1</sup>/jour. Alors que la concentration 10mg/mL a donné un temps de génération plus long estimé à trois jours et demi ( $G=3,55$ ) avec une amélioration des autres paramètres de cinétique par rapport à la concentration 5mg/mL et au témoin

On peut conclure que l'extrait brut du Thym testé dans ce travail a montré une bonne activité antimicrobienne non négligeable contre la flore bactérienne de lait cru de bovin. Ces résultats renforcent l'utilisation de *T.numidicus* comme un bioconservateur de lait cru de bovin.

Dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de :

- évaluer la qualité sensorielle de lait cru additionné de l'extrait hydroéthaolique de *T. numidicus*.
- élargir la gamme des concentrations de l'extrait additionné au lait (2,5 mg/mL et 7,5 mg/mL).
- réaliser des études phytochimiques spectrales afin de caractériser les molécules responsables à l'effet antibactérien, déterminer les activités biologiques de l'extrait (antioxydante et antibactérienne) et appliqué dans l'industrie agroalimentaire pour réduire les impacts indésirables et prolonger la durée de conservation.

Le fait que les huiles essentielles sont des matières complexes, très actives et très concentrées ce qui nous permet de suggérer l'étude de l'effet de l'addition des HE de notre espèce au lait.

Nous tant que futurs chercheurs doivent étudier les espèces d'herbes trouvées dans la région de Mila car leur couverture végétale est très riche en plantes médicinales qui n'ont pas reçu l'attention scientifique suffisante.

## Références

- Abd El Kader.M. A. et Mohamed.N. Z. (2012).** Evaluation of Protective and Antioxidant Activity of Thyme (*Thymus Vulgaris*) Extract on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats, Australian, *Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(7) : 467-474
- Agabriel, C., Coulon, J. B., Sibra, C., & Hauwuy, A. (1997).** Facteurs de variation de la numération cellulaire du lait en exploitation. In *Annales de zootechnie*, Vol. 46, No. 1, 13-19.
- Aggad, H., Mahouz, F., Ahmed Ammar, Y., & Kihal, M. (2009).** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Rev. Méd. Vét*, 160(12), 590-595.
- Ait Kaki, F., Benkiniouar, R., Touil, A., Demirtas, I., Merzoug, A., & Khattabi, L. (2021).** *Thymus numidicus* : phenolic constituents, antibacterial, and antioxidant activities of butanolic extract, *Environmental and Experimental Biology* 19 : 67–72.
- Al-Bayati, F. A. (2008).** Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 403-406.
- Asnoug, Z. B., Butel, M. J., & Ouzrout, R. (2012).** Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 65(1-2), 5-9.
- AUGUSTIN, J.C. (2005).** Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris XII Val de Marne, 25.
- Axelsson, L. (2004).** Chapter lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. *CRC Press*, 3<sup>ed</sup> edition, 1-62.
- Barton, D., & Meth-Cohn, O. (1999).** Comprehensive natural products chemistry. *Elsevier*, 8500.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009).** Milk and dairy products. *Food chemistry*, 498-545.

**Belmamoun, A. R. (2017).** Étude microbiologique, épidémiologique et antibiorésistance du *Staphylococcus aureus* dans le lait de vache atteinte de mammites. Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie, Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès, 186.

**Benayache, F., Boureghda, A., Ameddah, S., Marchioni, E., & Benayache, S. (2014).** Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. *Der Pharmacia Lettre*, 6(2), 50-54

**Bendif, H., Peron, G., Miara, M. D., Sut, S., Dall'Acqua, S., Flamini, G., & Maggi, F. (2020).** Total phytochemical analysis of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria by HS-SPME-GC-MS, NMR and HPLC-MSn studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 186.

**Benhedane, N. (2012).** Qualité Microbiologique Du Lait Cru Destine A La Fabrication D'un Type De Camembert Dans Une Unité De L'est Algérien, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, Université MENTOURI -Constantine, 123.

**Benkiniouar, R., Touil, A., Zaidi, F., Rhouati, S., Chosson, E., Seguin, E., ... & Bellvert, F. (2010).** ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FIVE FREE FLAVONOID AGLYCONES FROM *Thymus numidicus*. *Journal of the Algerian Chemical Society/Journal de Société Algérienne de Chimie*, 20(1).

**Benomari, F. Z., Djabou, N., Moumani, M., Hassani, F., Muselli, A., & Costa, J. (2020).** Chemical variability of essential oils of three subspecies of *Thymus munbyanus* Boiss. & Reut. from Western Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 32(5), 474-484.

**Bertouche, S (2009).** Optimisation des procédés de récupération d'extrait naturels d'origine végétale. Faculté de génie mécanique et génie des procédés. Université des sciences et de la technologie Houari Boumedienne.107(13-15).

**BEUVIER, E & FEUTRY, F. (2005).** Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage..., *Publication de INRA-unité de recherche en technologie et analyses laitiers*, 156,6.

**Bohui, G. S. P., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de

plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46, 50-58.

**Bondi, M., Lauková, A., de Niederhausern, S., Messi, P., & Papadopoulou, C. (2017).** Natural preservatives to improve food quality and safety. *Journal of Food Quality*, 2017.

**Bonfoh, B., Roth, C., Traoré, A. N., Fané, A., Simbé, C. F., Alfaroukh, I. O., ... & Zinsstag, J. (2006).** Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food control*, 17(2), 153-161.

**Bony, J., Contamin, V., Gousseff, M., Metais, J., Tillard, E., Juanes, X., & Decruyenaere, V. (2005).** Facteurs de variation de la composition du lait à la Réunion. *INRA Prod. Anim*, Vol.18 (4), 255-263.

**Bornert, G. (2000).** Intérêts et limites des analyses microbiologiques de denrées dans une stratégie de maîtrise de la sécurité des aliments. Cas de la restauration collective. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 153(4), 433-442

**Boubendir, A., Serrazanetti, D. I., Hamidechi, M. A., Vannini, L., & Guerzoni, M. E. (2016).** Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. *Annals of Microbiology*, 66(2), 777-783.

**Bouchair, K., Boubendir, A., & Serrer, A. (2021).** Dynamic change of psychrotrophic bacterial populations in Algerian refrigerated raw cow milk. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(1), 2773-2780.

**Boughendjioua, H., & Djeddi, S. (2018).** Quality attributes of the Thyme (*Thymus numidicus* Poiret.) essential oil. *J. Plant Sci*, 6, 12-15.

**Boukhatem, M. N., Ferhat, A., et Kameli, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.

**Boutaoui, N., Zaiter, L., Benayache, F., Benayache, S., Carradori, S., Cesa, S., ... & Locatelli, M. (2018).** Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules*, 23(2), 463.



- Boutinaud, M., & Guinard-Flament, J. (2004).** The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 499-508.
- Bouymajane.A, Rhazi Filali.F, Oulad El Majdoub Y, Ouadik.M, Abdelilah.R, Cavò.E,Miceli.N, Taviano.M.F, Mondello.L, et Cacciola.F (2022) :** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of extracts from aerial parts of *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Mentha suaveolens* and *Sideritis incana* from Morocco. *Chemistry & Biodiversity*, 19(3).
- Bruslind. L. (2022).** Cour microbiologie : microbial growth . Oregon state university. revué, *biology libre texts*, 9.1\_9.3
- Buchanan, R. E. (1918).** Life phases in a bacterial culture. *The Journal of Infectious Diseases*, 109-125.
- Burt, S. (2004).** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* Vol 94.223-253
- Callon,C ., Delbès,C., Monsallier,F ., Montel,M.C ., Barral,J ., Pélissier,F., Laithier,C ., Parguel P, Raynaud,S ., Roussel,P ., Desmasures,N)., Bouton,Y ., Bérodièr,A ., Michel.V ., Beuvier.E ., Demarigny,Y., Spinnler, E.S et Tormo,H .(2011).** Microflore du lait cru. *RMT filières fromagères valorisant leur terroir*, 134.
- Cemprikova, R. (2002).** Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Vet. Med. – Czech*, 47, 2002 (8) : 227–233
- CHIKHOUNE, A. (2007).** Huiles essentielles de Thym et d’origan. Faculté de sciences alimentaires, Institut National agronomique El- Harrach- Alger,151.
- Croissance des bactéries. (2014).** Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, Université Médicale Virtuelle Francophone (UMVF), 13.
- Djenane, D., Yangüela, J., Derriche, F., Bouarab, L., & Roncales, P. (2012).** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens ; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technology*, (7), 53.

- Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.
- Elhadj, T., Samira, B., Messaouda, H., & Nassira, B. (2015).** Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de laits crus de vache dans deux fermes de la wilaya de Tissemsilt (Algérie). *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes*, Vol. 8(2), 26-33.
- FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *Food & Agriculture Org*, Vol. 28, 271.
- Fecka, I., & Turek, S. (2008).** Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae : thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108(3), 1039-1053.
- Flandrois, J.-P. (1997).** Bactériologie médicale, *Presses Universitaires Lyon*, 309.
- Frandsen, R. D., Spurgeon, T. L., Frandsen, & Surgeon. (1965).** Anatomy and physiology of farm animals, (No. 04
- Freund, G. (1997).** Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre : Niort (France), *Editions Quae*. No. 81.
- Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Terentjeva, M., ... & Kačániová, M. (2021).** *Thymus serpyllum* Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver. *Plants*, 10(7), 1416.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani, Z., & Malekpoor, F. (2015).** An overview on genus *Thymus*. *Journal of Medicinal Herbs*, 6(2), 93-100.
- Gschwendtner, S., Alatosava, T., Kublik, S., Fuka, M. M., Schloter, M., & Munsch-Alatosava, P. (2016).** N<sub>2</sub> gas flushing alleviates the loss of bacterial diversity and inhibits psychrotrophic *Pseudomonas* during the cold storage of bovine raw milk. *PLoS One*, 11(1),
- Guetouache, M., Guessas, B., et. Medjekal, S.(2014).** Composition and nutritional value of raw milk. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. Vol 2(10) .115-122.

**Hadef, Y., Kaloustian, J., Chefrour, A., Mikail, C., Abou, L., Giodani, R., ... & Portugal, H. (2007).** Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria. *Acta Botanica Gallica*, 154(2), 265-274.

**Hamdani, S., Asstiyani, N., Astriany, D., Singgih, M., & Ibrahim, S. (2019, February).** Isolation and identification of proteolytic bacteria from pig sludge and protease activity determination. In *IOP Conference Series : Earth and Environmental Science* Vol. 230, No. 1.

**Harding, F. (1995).** Milk quality. New York : Blackie Academic & Professional, 60-95.

**Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009).** Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food chemistry*, 116(3), 714-721.

**Hintz, T., Matthews, K. K., & Di, R. (2015).** The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. *BioMed Research International*, 1–12.

**Iserin, P. (2001).** Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales. *Larousse*. 336.

**Jaouadi, R., Silva, A., Boussaid, M., Yahia, I. B., Cardoso, S. M., & Zaouali, Y. (2019).** Differentiation of phenolic composition among tunisian thymus algeriensis boiss. Et reut. (lamiaceae) populations: correlation to bioactive activities. *Antioxidants*, 8(11), 515.

**Jaworska, D., Rosiak, E., Kostyra, E., Jaszczyk, K., Wroniszewska, M., & Przybylski, W. (2021).** Effect of herbal addition on the microbiological, oxidative stability and sensory quality of minced poultry meat. *Foods*, 10(7), 1537.

**Jeantet, R. Croguennec, T., Schuk, P., Mahaut, M., Brulé, G. (2008).** Les produits laitiers 2e éd, *Lavoisier*, 185.

**Júnior, J. C. R., Beloti, V., Massi, F. P., & Fungaro, M. H. P. (2017).** Thermotrophic psychrotrophic proteolytic microbiota from refrigerated raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(1), 267-271.

**Kabouche, A. (2005).** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Diplôme de Doctorat d'état en chimie, Université mentouri-Constantine, 385.

- Kabouche, A., Kabouche, Z., & Bruneau, C. (2005).** Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 235-236.
- Kamga, V. A. M. S., Ayong, M. N. A., Talla, C. F., Pamela, K. N., Tchameni, S. N., & Jazet, P. M. D. (2022).** Microbicidal Effect of Thyme (*Thymus vulgaris*) Essential Oil against *Phytophthora megakarya*, the Causative Agent of Cocoa Black Pod Disease. *American Journal of Microbiological Research*, 10(1), 17-22.
- Khalil, N., Dabour, N., & Kheadr, E. (2021).** Food Bio-Preservation: An Overview with Particular Attention to *Lactobacillus plantarum*. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 18(1), 33-50.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A. C., & Alwasel, S. H. (2017).** Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 514-525.
- Kouch, M. (2015).** Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale endémique algérienne « *Thymus numidicus* Poiret ». Faculté Des Sciences Département De Biochimie, Université Badji Mokhtar – Annaba, 148.
- Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017).** Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan *Thymus satureioides* extracts. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(6), 2132-2139.
- Lanez, T., Rebiai, A., & Belfar, M. L. (2014).** Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of Algerian propolis. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(1), 395-400.
- Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Meierhenrich, U. J., Baldovini, N., & Prado, S. (2009).** Composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *thymus numidicus* poiret. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 374-377.
- Lapointe-Vignola, C. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses inter Polytechnique*, 600.

- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2017).** The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in microbiology*, 8, 302.
- Macheboeuf, D., Coulon, J. B., & D'Hour, P. (1993).** Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research*, 60(1), 43-54.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, 192.
- Maiworé, J., Baane, M. P., Toudjani Amadou, A., Daibe Ouassing, A., Tatsadjieu, N. L., & Montet, D. (2018).** Influence des conditions de la traite sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait cru collecté à Maroua, Cameroun. *Afrique SCIENCE*, 14(4), 235 - 248
- Mamadou, R. S., Moussa, I., Sessou, P., Yehouenou, B., Agbangnan, P. D., Illagouma, A. T., ... & Ikhiri, K. (2014).** Etude phytochimique, activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique d'extraits de *Sebastiania chamaelea* (L.) Müll. Arg. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 37, 10-17.
- Martinez, K. P., Cabeza, E. A., & Soto, J. A. (2020).** Effect of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) on the growth of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* paratyphi on surfaces of chilled raw bovine meat.
- Medoatinsa, S. E., Dossa, C. A., Viwami, F., Bogninou-Agbidinokoun, G. S. R., Noudogbessi, J. P., Lagnika, L., ... & Sohounhloue, D. C. K. (2015).** In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of ethanolic and hydroethanolic extracts of *Hyptis suaveolens*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(08).
- Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., & Messaoudi, Z. A. (2019).** Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41, 48548.

- Messara, Y., Fernane, F., & Meddour, R. (2018).** Chemical composition, antibacterial, and antifungal activities of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Phytothérapie*, 16(3), 163-168.
- Meyer, C., & Denis, J. P. (1999).** Elevage de la vache laitière en zone tropicale. *Editions Qua*, 314.
- Monique, Z., & Souad, C. (2013).** Flores protectrices pour la conservation des aliments. Editions Qua, 147.
- Morales, R. (2002).** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: the genus Thymus*, 1, 1-43.
- Mottar, J. (1984).** Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UHT. *Le Lait*, 64(635-637), 29-45.
- Mousavi, S. M., Wilson, G., Raftos, D., Mirzargar, S. S., & Omidbaigi, R. (2011).** Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria. *Aquaculture international*, 19(1), 205-214.
- Nadia, Z., & Rachid, M. (2013).** Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 1(1), 5-11.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S. M., & Ghorbani, A. (2022).** Labiatae family in folk medicine in Iran : from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 63-79.
- Nieto, G. (2020).** A review on applications and uses of thymus in the food industry. *Plants*, 9(8), 961.
- NÖRNBERG, M. F., Friedrich, R. S., Weiss, R. D., Tondo, E. C., & Brandelli, A. (2010).** Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 41-46.
- Özcan, M., & Chalchat, J. C. (2004).** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30(3-4), 68-73.

- Özer, B., & Akdemir-Evrendilek, G. (2014).** Dairy microbiology and biochemistry: recent developments. CRC Press, 464.
- Pierre, M et Lys, M. (2007).** Secrets des plantes pour se soigner naturellement. *Editions Artemis*, 463.
- Quezel, P. et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. *CNRS, Paris*.
- Quinto E. J., Caro I., Villalobos-Delgado L. H., Mateo J., De-Mateo-Silleras B., Redondo-Del-Río M. P. (2019).** Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4), 208.
- Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M., & Sayed Tabatabaei, B. E. (2009).** Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis subsp. daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochemical genetics*, 47(11), 831-842.
- Saidj, F. (2007).** Extraction des essences du thymus numedius kabylliica. Faculté Des Hydrocarbures Et La Chimie, Université de Boumerdès-M'hamed Bougara, 102.
- Saidj, F., Rezzoug, S. A., Bentahar, F., & Boutekdjiret, C. (2008).** Chemical composition and insecticidal properties of *Thymus numidicus* (Poiret) essential oil from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(4), 397-405.
- Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., Salgueiro, L., ... & del Mar Contreras, M. (2019).** *Thymus* spp. Plants-Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 287-306.
- Salehi, B., Shivaprasad Shetty, M., V Anil Kumar, N., Živković, J., Calina, D., Oana Docea, A., & Sharifi-Rad, J. (2019).** Veronica plants—Drifting from farm to traditional healing, food application, and phytopharmacology. *Molecules*, 24(13), 2454.
- Shaban, M. M., Abdel-Aleem, W. M., & Galal, S. M. (2021).** Organic Propolis Extract as a Natural Fortifier and Preservative for Milk. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 12(12), 325-329.

- Silva, A. M., Martins-Gomes, C., Souto, E. B., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., & Nunes, F. M. (2020).** Thymus zygis subsp. zygis an endemic portuguese plant: Phytochemical profiling, antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities. *Antioxidants*, 9(6), 482
- Singh, V. P. (2018).** Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, Vol. 8(1), 104-111.
- Soraya, R. (2022).** Inhibitory power and probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from cow's milk from the chlef region, algeria. *Lulu publication*. 91.
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., ... & Kharwar, R. N. (2021).** Advances in extraction technologies : Isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. In *Natural Bioactive Compounds* ,409-433.
- Sunar, S., Aksakal, O., Yildirim, N., Agar, G., Gulluce, M., & Sahin, F. (2009).** Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(2), 4313-4318.
- Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., Nunes, F. M., & Silva, A. M. (2019).** Chemical characterization and bioactivity of extracts from *Thymus mastichina* : A Thymus with a distinct salvianolic acid composition. *Antioxidants*, 9(1), 34.
- Tzima, K., Makris, D., Nikiforidis, C. V., & Mourtzinis, I. (2015).** Potential use of rosemary, propolis and thyme as natural food preservatives. *J. Nutr. Health*, 1(6).
- Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Węgrzyn, G. (2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62(2), 132-135.
- Ündeğer, Ü., Başaran, A. R. İ. F., Degen, G. H., & Başaran, N. (2009).** Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology*, 47(8), 2037-2043.



**Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G. D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., ... & Tamba, B. I. (2018).** Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*, 2018.

**Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019).** Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in microbiology*, 10, 57.

**Vilain, A. C. (2010).** Qu'est-ce que le lait?. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127.

**Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N. (2016).** Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, 80-90.

**Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N. (2017).** Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. *Journal of Dairy Research*, 84(1), 92-101.

**Weber, F. (1985).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports *Food & Agriculture Org*, Vol. 47, 216.

**Yabrir, B., Zobiri, A., Laoun, A., Titouche, Y., Chenouf, N. S., Ranebi, D., & Mati, A. (2018).** Comportement bactériologique de lait cru ovin produit en milieu steppique algérien et réfrigéré à 4 C ou à 7 C. *Livestock Research for Rural Development*, 30(2).

**Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N. I., & He, G. (2019).** Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *Journal of food protection*, 82(7), 1148-1159.

**Zeghib, A. (2013).** Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*. Faculté Des Science Exactes, Université De Constantine 1.

**Zellagui, A., Boutellaa, S., Arab, Y et Gherraf, N. (2014).** GC/MS Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oil leaves *Thymus numidicus* Poiret. growing in Mila, *Journal of New Technology and Materials*, Vol. 04, N°01 155-160.

**Zerai, T., Mestiri, F., Romdhane, M. S., Mejri, S. (2006).** Effet de l'addition du thym, du laurier et du romarin sur la conservation de l'anguille fumée. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM)*, vol 33, p. 107 -116.

# Annexes

## Annexes

**Annexe 01** : principales matériels et produits utilisés.

| Matériels et appareillages   | Milieux de culture   | Solvants et réactif utilisés                 |
|--|--|--|
| Autoclave<br>Rotavapor<br>Etuve<br>plaque -Agitatrice<br>plaque-chauffante<br>Vortex<br>Réfrigérateur<br>Bec benzène<br>Tubes à essai<br>Boîtes de Pétri<br>Micropipettes<br>Pipettes pasteur<br>Pince<br>Spatule<br>Erlenmeyer<br>Papier filtre<br>pH-mètre<br>Bain- marie<br>Hotte | Gélose nutritif (GN)<br>Gélose Chapman<br>Gélose Hektoen<br>Gélose MRS | Eau distillé<br>Eau physiologique<br>Éthanol |

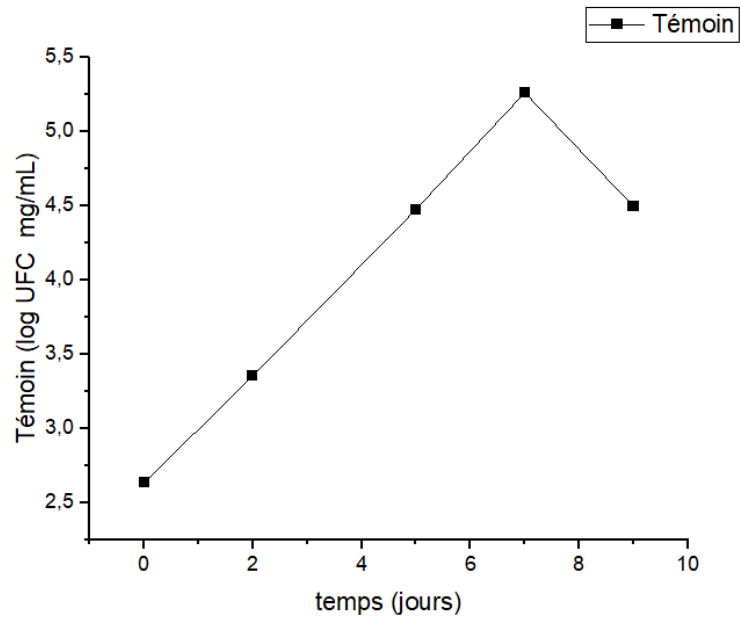
**Annexe 02** : tableau l'évolution du pH dans le témoin et le lait traité par différente concentration.

| Jours | pH     |                |                |
|-------|--------|----------------|----------------|
|       | Témoin | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> |
| 0     | 6.99   | 7.01           | 7.02           |
| 2     | 7.00   | 7.02           | 7.03           |
| 5     | 6.98   | 6.98           | 6.98           |
| 7     | 6.96   | 6.96           | 6.97           |
| 9     | 6.96   | 6.95           | 6.95           |

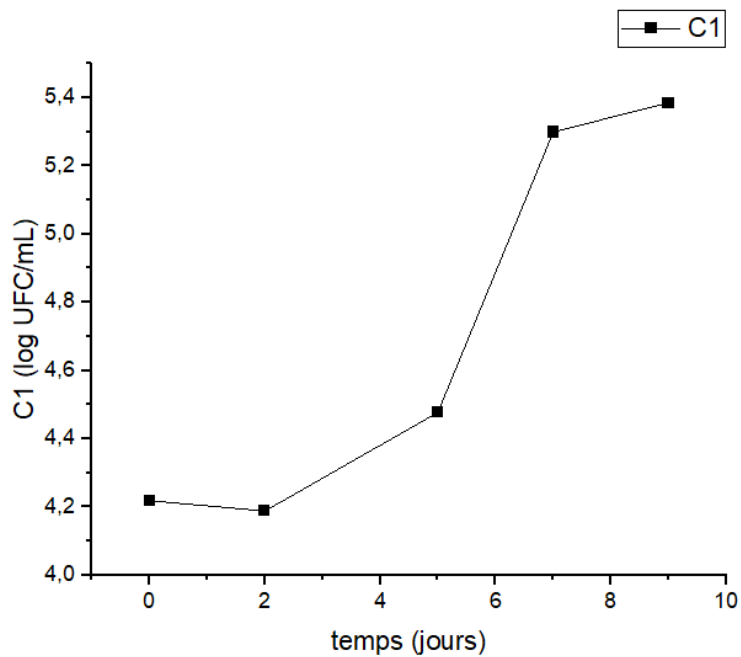


**Annexe 05** : Moyennes de deux répétitions du dénombrement, écarts types et valeurs de log UFC.

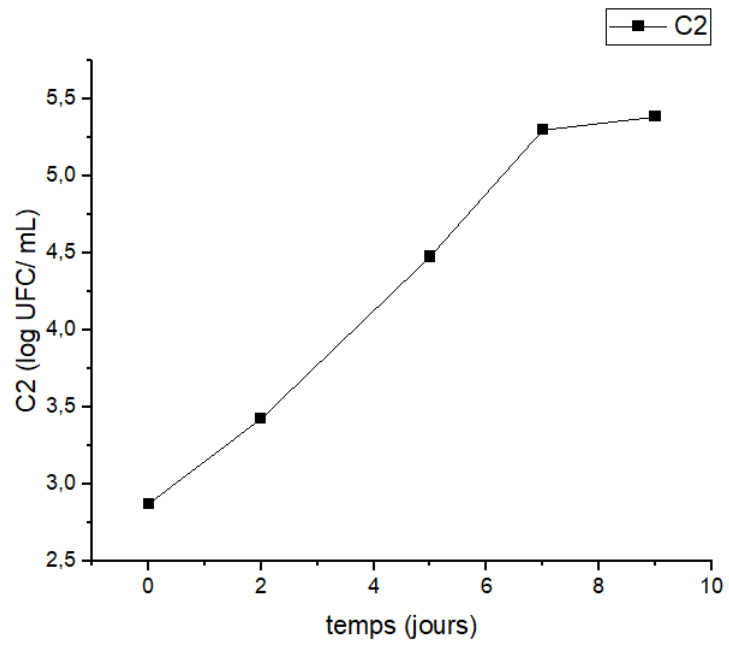
|                         |          | 0          |       | 2          |         | 5           |         | 7           |          | 9           |          |
|-------------------------|----------|------------|-------|------------|---------|-------------|---------|-------------|----------|-------------|----------|
| Témoin                  | UFC/mL   | 170        | 690.9 | 20827.27   | 1700    |             |         | 333636.63   | 32818.18 | 32818.18    | 29818.18 |
|                         | Moyenne  | 430.45     |       | 2263.635   |         |             |         | 183227.405  |          | 3138.18     |          |
|                         | Ecartype | 368.33     |       | 797.10     |         |             |         | 212710.7659 |          | 2121.320344 |          |
|                         | LogUFC   | 2.58695843 |       | 2.90151280 |         |             |         | 5.32778647  |          | 3.32660625  |          |
| C <sub>1</sub> =5mg/mL  | UFC/mL   | 20545.45   | 12500 | 23800      | 7000    |             |         | 228181.81   | 170000   | 215000      | 270000   |
|                         | Moyenne  | 16522.725  |       | 15400      |         |             |         | 199090.905  |          | 242500      |          |
|                         | Ecartype | 5688.99    |       | 11879.39   |         |             |         | 41140.75239 |          | 38890.87297 |          |
|                         | LogUFC   | 3.75503517 |       | 4.07479414 |         |             |         | 4.61427223  |          | 4.58984769  |          |
| C <sub>2</sub> =10mg/mL | UFC/mL   | 700        | 790   | 2690.9     | 1636.36 | 2690.9      | 1818.18 | 19000       | 3745.45  | 3100        | 1354.54  |
|                         | Moyenne  | 745        |       | 2163.63    |         | 2254.54     |         | 15772.72    |          | 19318.18    |          |
|                         | Ecartype | 63.64      |       | 745.67     |         | 617.1062301 |         | 1304.930209 |          | 1234.226602 |          |
|                         | LogUFC   | 1.80373017 |       | 2.87254667 |         | 2.79035993  |         | 3.11558728  |          | 3.09139490  |          |



**Annexe 06 :** L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C non additionné (non modalisée)



**Annexe 07 :** L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de *T.numidicus* à 5mg/mL (non modalisée)



**Annexe 08 :** L'évolution de la croissance bactérienne du lait réfrigéré à 4°C additionné d'extrait de *T.numidicus* à 10 mg/mL (non modalisée)



## Résumé

Le Thym est parmi les plantes aromatiques médicinales les plus populaires en Algérie, et qui a des propriétés biologiques très diverses. Le présent travail a pour but d'étudier l'effet de l'addition de l'extrait brut de *T.numidicus* au lait bovin afin d'améliorer leurs qualités microbiologiques. L'extrait hydroéthanolique préparé à partir des parties aériennes de *T.numidicus* par macération dans l'éthanol 50% était rentable (8,71%). La cinétique de croissance bactérienne a été suivie durant le stockage à froid du lait pendant dix jours à intervalle régulier, et les paramètres de croissance ont été déterminés. Les résultats obtenus ont montré une amélioration de la stabilité du lait par prolongation de la durée de vie (shelf-life). Ces résultats sont encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation de l'extrait hydroéthanolique de *T.numidicus* comme agent antimicrobien naturel pour la conservation du lait.

**Mots clés :** *Thymus numidicus*, extrait hydroéthanolique, lait, activité antimicrobienne, Cinétique de croissance, bioconservateur.

## **Abstract**

Thyme is among the most popular medicinal aromatic plants in Algeria, and has very diverse biological properties. The purpose of this work is to study the effect of the addition of *T.numidicus* crude extract to cattle milk in order to improve their microbiological qualities. The hydroethanolic extract prepared from aerial parts of *T.numidicus* by maceration in ethanol 50% was profitable (8.71%). Bacterial growth kinetics were monitored during milk cold storage for ten days at regular intervals, and growth parameters were determined. The results obtained showed an improvement in the stability of milk by extending its shelf-life. These results are encouraging and open a promising path for the use of *T.numidicus* hydroethanolic extract as a natural antimicrobial agent for milk preservation.

**Key words :** *Thymus numidicus*, hydroethanolic extract, milk, antimicrobial activity, Growth kinetics, biopreservative

## ملخص

الزعر من بين النباتات العطرية الطبية الأكثر انتشارا في الجزائر، وله خصائص بيولوجية متنوعة للغاية. الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير إضافة المستخلص الخام لنبته *T.numidicus* إلى حليب البقر من أجل تحسين جودتها الميكروبيولوجية. سمحت عملية الاستخلاص بطريقة النقع في محلول ايثانول 50% بالحصول على مردود معتبر بنسبة 8.71%. تمت مراقبة حركية نمو البكتيريا أثناء تخزين الحليب البارد لمدة عشرة أيام على فترات منتظمة، وتم تحديد معايير النمو. وقد أظهرت النتائج تحسناً في استقرار الحليب من خلال تمديد فترة صلاحيته. هذه النتائج مشجعة وتفتح مساراً واعداً لاستخدام مستخلص نبتة الزعر كعامل طبيعي مضاد للبكتيريا للحفاظ على الحليب.

**الكلمات المفتاحية:** *Thymus numidicus*، مستخلص هيدروإيثانول، حليب، فعالية ضد ميكروبية، حركية النمو، حافظ بيولوجي