

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

-M^{lle} KHOUIDEM Fatima Zohra

- M^{lle} TAMACHA Ahlem

- M^{lle} ZIGHMI Chaimaa

Thème

Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques du
thym (*Thymus fontanesii*) vis-à-vis des souches communautaires de
Staphylococcus aureus multirésistantes

Soutenu publiquement le 30/09/2020

Jury:

Président: Dr. HEMIDA Houari

Encadrant: Dr. BOUMEZRAG Assia

Examineur: Dr. BENARABA Rachida

Grade

MCA

MCB

MCA

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant pour nous avoir donnés la santé, la force, le courage et la volonté afin de mener à bien ce travail.

*Nous tenons à remercier sincèrement et très chaleureusement notre Encadreur **Dr. BOUMEZRAG Assia** pour ses précieux conseils, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail, sa gentillesse et son aide durant la période du travail.*

*Nos vifs remerciements sont également adressés aux membres du jury; **Dr. HEMIDA Houari** et **Dr. BENARABA Rachida** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter l'évaluation de ce travail.*

*Nous tenons à remercier tous les techniciens de laboratoire de Microbiologie; Mademoiselle **Ait Naamane Karima**, Monsieur **Benhlime, Bachir** et Monsieur **Houari** pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide durant la réalisation du travail.*

*Nous remercions aussi Monsieur **Benchaib** et Madame **Belhadj**, du laboratoire de **Dr. Mâachi** pour leur aide dans le travail sans oublier de remercier tous nos enseignants des cinq années d'études.*

Enfin, nous tenons également à remercier toute les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui mon permis de continuer mes études dont les meilleures conditions.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

- Mon cher frère **Tayeb** ;
- La famille **Tamacha, Koussa et Zahri** (surtout à toi **Mourad**) ;
- Mes chers amis et mes collègues.

Ahlem

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

- Mes frères **Abdelghani** et **Mohamed** ;
- Mes sœurs **Zineb** et **Mahdjouba** ;
- Ma famille **Khoudem** et **Kacem**.
- Mes amis et mes collègues.

Fatima Zohra

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mes frères Said et Mohamed et Abd elhalim et Khaled

A mes sœurs Fatima et Aicha et KHeira et Aouatif

A Mes Beaux-parents Mr Aek et Mme Oum daher

A mon amour, mon fiancé Khaled :

Pour ta patience, ton écoute et ton soutien dans les moments de doute, pour tout le bonheur et l'attention que tu m'apportes chaque jour, pour tous ces merveilleux moments partagés et ceux qui sont à venir. Avec tout mon amour.

A mes chères tantes, chers oncles, chères cousines et chers cousins.

A mes familles Zighmi, Youcefi ,Cheikh sans exception du petit au grand.

A mes collègues Ahlem et Fatima d'avoir eu le courage d'achever ce travail malgré tout ce qu'elle a enduré.

Une dédicace spéciale à Mme BOUMEZRAG Assia pour ses conseils, son aide précieuse et sa gentillesse.

A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin durant la réalisation de ce travail

Chaimaa

Table des matières

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des annexes.....	iv
Introduction	

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Chapitre I : Généralités sur *Staphylococcus aureus*.

I.1. Définition.....	3
I.2. Taxonomie.....	3
I.3. Habitat.....	3
I.4. Caractères bactériologiques.....	3
I.4.1 Caractères culturels.....	3
I.4.2 Caractères morphologiques.....	3
I.4.3 Caractères biochimiques.....	4
I.5. Facteurs de virulences.....	4
I.6. Pouvoir pathogènes.....	5
I.6.1. Infection suppurative.....	6
I.6.1.1 Infection suppurative cutanéomuqueuse.....	6
I.6.1.2 Infection suppurative profonde.....	6
I.6.2. Toxémie staphylococcique.....	7
I.7. Résistance aux antibiotiques.....	7
I.7.1. Définition de la résistance.....	7
I.7.2. Mode d'émergence de la résistance bactérienne.....	7
I.7.2.1. Résistance naturelle.....	7
I.7.2.2. Résistance acquise.....	7
I.7.2.2.1. Mécanisme génétique de la résistance acquise.....	7
I.7.2.2.2. Mécanisme biochimique de la résistance acquise.....	8
I.7.3. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques.....	8
I.7.3.1 Résistance à la bêta-lactamine.....	8
I.7.3.2 Résistance à la méthiciline.....	10
I.7.3.3. Résistance aux tétracyclines.....	10
I.7.3.4 Résistance aux sulfamides.....	11
I.7.3.5. Résistance aux aminosides.....	11
I.7.3.6. Résistance aux macrolides.....	12
I.7.4. Multi-résistance bactérienne.....	12
<i>Chapitre II : Le thym et les composés phénoliques.</i>	
II.1. Définition.....	14
II.1. Taxonomie.....	14

II.2. Description botanique.....	14
II.3. Répartition géographique.....	15
II.4. Propriétés de <i>Thymus fontanesii</i>	15
II.4.1. Propriétés thérapeutiques.....	15
II.4.2. Propriétés industrielles.....	15
II.5. Généralité sur Composés phénolique.....	15
II.5.1. Définition.....	15
II.5.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	15
II.5.3. Classification.....	16
II.5.4. Propriétés biologiques des polyphénols.....	17
II.5.5. Activités des composés phénoliques.....	17
II.5.5.1. Activité thérapeutique.....	17
II.5.5.2. Activités antimicrobienne.....	18

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1. Objectif du travail.....	19
III.2. Lieu et durée de l'étude.....	19
III.3. Matériels.....	19
III.3.1. Matériel végétal.....	19
III.3.2. Matériel biologique.....	20
III.3.3. Matériel de laboratoire.....	20
III. 4. Méthodes.....	21
III.4.1. Extraction des composés phénoliques.....	22
III.4.1.1. Calcul du rendement d'extraction.....	22
III.4.2. Evaluation <i>in-vitro</i> de l'activité antibactérienne des extraits phénolique...22	22
III.4.2.1. Culture.....	22
III.4.2.2. Identification bactérienne.....	23
III.4.2.2. 1. Examen macroscopique.....	23
III.4.2.2. 2. Examen microscopique.....	23
III.4.2.2. 3. Examen biochimique.....	23
III.4.2. 3. Activité antibactérienne.....	24
III.4.2. 3.1. Antibiogramme standard.....	24
III.4.2. 3.2. Activité antibactérienne des extraits phénoliques.....	25

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV.1. Extraction des composés phénoliques.....	26
IV.1.1. Rendement d'extraction.....	26
IV.2. Activité antibactérienne.....	27
IV.2.1. Identification des isolats cliniques (antibiogramme standard).....	27
IV.2.2. Teste de sensibilité aux antibiotiques.....	28
IV.2.3. Effet antibactérien des extraits de <i>Thymus fontanesii</i>	29
Conclusion et perspectives	32
Référence bibliographique	33

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique.

API: Analytical Profile Index.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique.

BMR : Bactéries Multi-résistantes.

CLSI : Dillution Antimicrobial Susceptibility.

EAFT : Extrait Aqueux des Feuilles de *Thymus fontanesii*.

EEFT : Extrait Ethanolique des Feuilles de *Thymus fontanesii*.

EFT: Toxine exfoliative.

EMFT : Extrait Méthanolique de Feuille de *Thymus fontanesii*.

LPV : Leucocidine de Panton-Valentine.

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule.

NH₂ : Hydridonitrate.

Nit : Nitrate réductase.

OH : Le groupe Hydroxyle.

PABA : Acide Para-Amino Benzoïque.

PLP : Protéines de la liaison aux pénicillines.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SARM-C: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline communautaire.

SARM-H: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline hospitalier.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SCC mec : Cassette chromosomique staphylococcique mec.

ST : Séquence type.

TSS : Choc toxique staphylococcique.

TSS-1 : Toxine-1 du choc toxique.

VP: Voges- Proskauer.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Matériel de laboratoire et produits utilisés.....	20
Tableau 02 : Tests de pré-identification des souches bactériennes.....	27
Tableau 03 : Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques	28
Tableau 04 : Diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) induites par les extraits phénoliques des feuilles de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des souches de <i>S.aureus</i> multi-résistantes	29

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Photographie représentant <i>S. aureus</i> sous microscope électronique	1
Figure 02 : Facteurs de virulence de <i>S.aureus</i>	5
Figure 03 : Infection cutanée à <i>S.aureus</i>	6
Figure 04 : Staphylococcie du visage après manipulation... ..	6
Figure 05 : Structure du noyau bêta-Lactame	9
Figure 06 : Plante de <i>Thymus fontanesii</i>	14
Figure 07: Matériel végétal utilisé dans l'étude	19
Figure 08: Organigramme du protocole expérimental	21
Figure 09 : Rendement d'extraction des composés polyphénoliques des feuilles de <i>Thymus fontanesii</i> pour les trois solvants	26

LISTE DES ANNEXES

Annexe 01: Composition des milieux de culture utilisés.

Annexe 02: Coloration de Gram.

Annexe 03. Table de Lecture de la galerie API Staph et profil biochimique de *Staphylococcus aureus* sur la galerie Api Staph.

Annexe 04. Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S. aureus* étudiées.

Annexe 05. Effet de l'extrait méthanolique des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S. aureus* étudiées.

Annexe 04. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S. aureus* étudiées.

Introduction

Introduction

La médecine humaine est confrontée depuis ces dernières années à l'émergence et à la dissémination rapide des bactéries multi-résistantes. Les impasses thérapeutiques devant les infections causées par de telles bactéries constituent une véritable menace pour la médecine humaine et vétérinaire **(Serradj, 2016)**.

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus* et fait partie des agents infectieux les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers **(Guillaume, 2014)**. Elle est à l'origine des infections suppuratives, localisées ou systémiques, ainsi que les syndromes spécifiques qui sont liés à l'action de toxines.

Les infections staphylococciques relèvent d'un véritable problème de santé publique tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques **(Djaidjai, 2016)**. En effet, ces bactéries multi-résistantes (BMR) limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par ces agents pathogènes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et une augmentation du taux de mortalité.

En raison de la propagation du phénomène de résistance bactérienne et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue indispensable **(Li et Webster, 2018)**.

Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles telles que les plantes aromatiques et médicinales apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent la plus grande réserve de substances actives notamment les huiles essentielles et les composés phénoliques.

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis l'antiquité en médecine traditionnelle comme remèdes à de nombreuses maladies **(Boukrif et Boukabous, 2019)**.

L'Algérie par son climat et sa situation géographique possède un ensemble de plantes aromatiques et médicinales qui représentent un patrimoine phylogénétique très important dans l'équilibre écologique **(Benmadi et Abida, 2018)**. Le thym est une plante aromatique caractéristique de la flore méditerranéenne et très réputée pour ses vertus médicinales dans le traitement de certaines infections particulièrement respiratoires et urogénitales.

Plusieurs espèces de thym ont été étudiées pour leurs effets antibactériens avec une attention particulière attribuée aux huiles essentielles. Cependant, peu de recherches se sont intéressées à l'effet antimicrobien des extraits phénoliques du thym.

Introduction

Dans cette optique, nous avons étudié l'activité antibactérienne des extraits phénoliques d'une espèce de thym poussant au nord de Tiaret ; *Thymus fontanesii*; contre des souches multi-résistantes de *Staphylococcus aureus* communautaires.

Ce manuscrit est structuré en deux parties :

1. Une étude bibliographique qui présente un premier chapitre sur les *Staphylococcus aureus* et sa résistance aux antibiotiques et un deuxième chapitre sur le thym et les composés phénoliques.
2. Une étude expérimentale portant sur l'évaluation de l'effet antibactérien des extraits phénoliques de *Thymus fontanesii* sur des souches communautaires de *Staphylococcus aureus* multi résistantes isolées à partir des infections uro-génitales.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I:
Généralités sur
Staphylococcus aureus

I.1. Définition

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques à gram+ appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* qui comprend 41 espèces et 21 sous-espèces isolées chez l'homme et l'animal (**Géraldine, 2009**).

En 1884 ; Rodenbacha décrit *Staphylococcus aureus* (Staph doré) qui colonise essentiellement la peau, les cavités nasale et buccale ainsi que le tractus gastro-intestinal.

I.2. Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition du **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, les staphylocoques sont classés selon l'ordre suivant (**Ouidiri et Houari, 2015**):

Règne : Bacteria.

Phylum : Firmicutes.

Classe : Bacilli.

Ordre : Bacillales

Famille : *Staphylococcaceae*.

Genre : *Staphylococcus*.

Espèce : *Staphylococcus aureus*

I. 3. Habitat

S. aureus est une bactérie ubiquitaire présente dans l'environnement (**Géraldine, 2009**). Cette bactérie fait aussi partie du microbiote naturel des humains et des animaux, principalement en colonisant la peau et les muqueuses nasales et buccales de l'homme et des animaux sains (**Serradj, 2016**).

I. 4. Caractères bactériologiques**I. 4. 1. Caractères culturels**

Staphylococcus aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultative; très résistante dans le milieu extérieur et peu exigeante en culture (**Clotilde, 2015**). Elle peut être également cultivée en milieu sélectif hyper salé comme le milieu de Chapman.

Les colonies observées après 24 heures d'incubation sur le milieu Chapman sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. Le pigment apparaît sous forme de colonies jaune à jaune orangée n'est pas toujours apparente (**Matthieu, 2007**).

I. 4. 2. Caractères morphologiques

À la coloration de Gram, *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme de coque à Gram positif de 0,5 à 1µm de diamètre associé par paire, en chaînette de 3 à 5 coques ou en amas

irréguliers en grappe de raisins (Fig.01). *S. aureus* est immobile et non sporulée. Il possède d'une capsule (**Michel, 2005**).

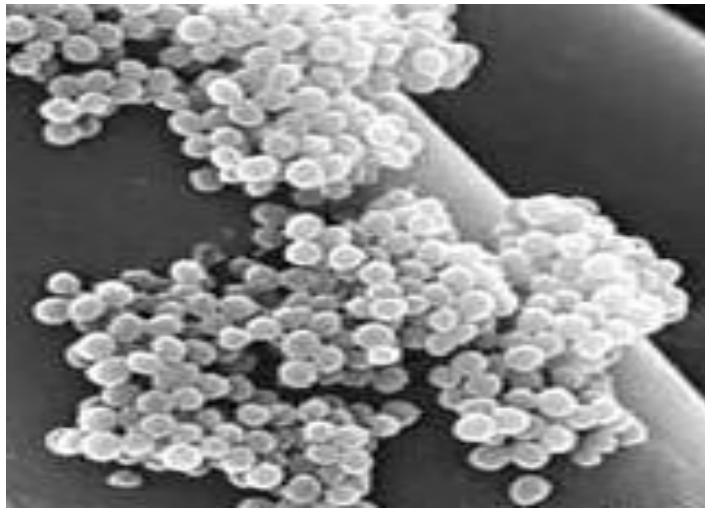


Figure 01 : Photographie représentant *S. aureus* sous microscope électronique (**Khelifi et Zemmouche, 2017**).

I. 4. 3. Caractères biochimiques

Toutes les souches de *S. aureus* produisent une catalase mais pas l'oxydase. Ce qui caractérise mieux l'espèce *Staphylococcus aureus* c'est la production d'une coagulase (**Bentrar et Bensnoui, 2016**).

S. aureus utilise le glucose, le mannitol et de nombreux autres sucres. D'autres caractères caractérisent le staph doré : Indole -, Uréase + ; réduction du tellurite de potassium, réduction des nitrates en nitrites et la production d'ammoniaque à partir de l'arginine (**Khelifi et Zemmouche, 2017**).

I. 5. Facteurs de virulence

S.aureus produit plusieurs facteurs de virulence qui peuvent contribuer de différentes façons à leur pathogénicité (Fig.02) (**Salmi et Zenati, 2017**).

Ces facteurs comprennent :

- **Les protéines de surface**

Ce sont des adhésines qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte, la grande majorité de ces adhésines appartiennent à la famille des MSCRAMM et forment un ensemble de protéines qui sont caractérisées par leur capacité à se lier à des éléments de la matrice extracellulaire.

Les adhésines lient à des molécules telles que le collagène et la fibronectine et initient les infections endovasculaires, osseuses et articulaires et aident dans la formation de biofilms.

Il y a aussi les protéines de liaison au fibrinogène et la protéine A qui possède également une activité superantigénique (Robert, 2013).

- **Les sidérophores**

S. aureus s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie (Matthieu, 2007).

- **Les enzymes**

S. aureus produit également de nombreuses enzymes impliquées dans sa virulence ; il s'agit de nucléases et de protéases permettant une pénétration des tissus et une adhésion sélective et aussi des lipases, des hyaluronidases et des collagénases (Robert, 2013).

- **Les toxines**

Certaines souches produisant également une ou plusieurs exotoxines telle que la leucocidine de Penton-Valentine (PVL), des toxines exfoliatives (EFT), des enterotoxines ou encore la toxine-1 du syndrome du choc toxique (TSS1) (Robert, 2013).

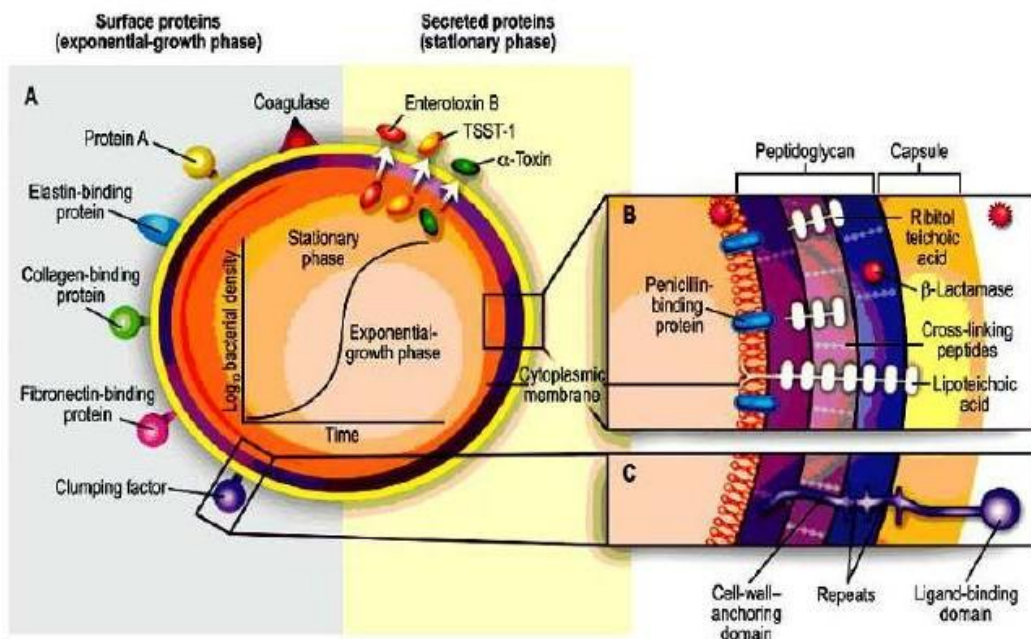


Figure 02. Facteurs de virulence de *S. aureus* (Salmi et Zenati, 2017).

I. 6. Pouvoir pathogène

Les infections à *Staphylococcus aureus* sont très fréquentes et répandues dans le monde ; ils sont d'origine endogène (Gaillard et Simonet, 1988). Il existe deux types d'infection :

I. 6.1. Infection suppurative

C'est une effraction cutanée ou bien une action chirurgicale, ce type d'infection implique également la prolifération bactérienne, l'invasion puis la destruction des tissus de l'hôte.

I. 6.1. 1. Infection suppurative cutanéomuqueuse

C'est une infection de la peau telle que l'impétigo, le furoncle et le panaris (Fig.03) et parmi les infections des muqueuses on trouve des sinusites, laryngites... (Géraldine, 2009).

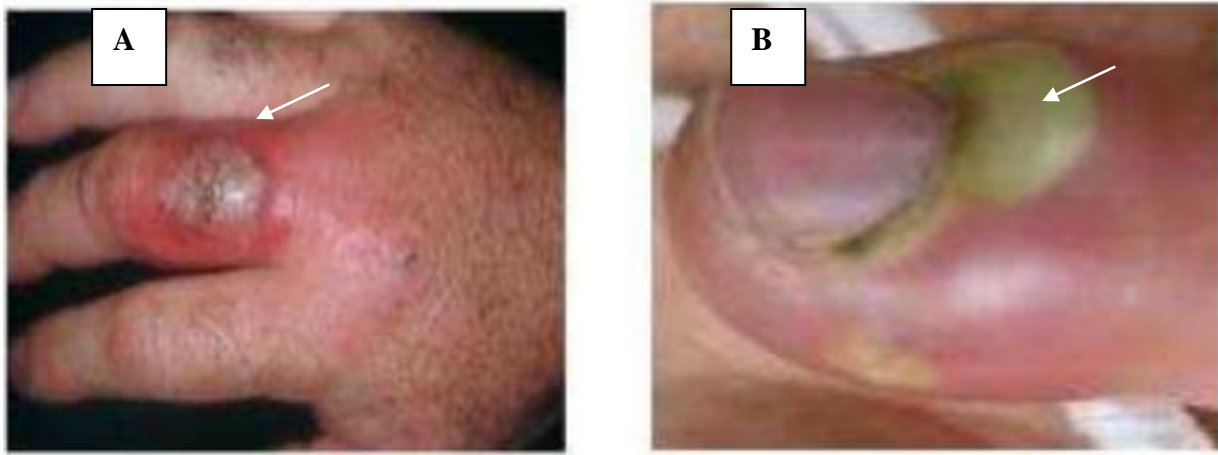


Figure 03. Infection cutanée à *S.aureus* ; **A.** Furoncle, **B.** Panaris (Géraldine, 2009).

I. 6.1. 2. Infection suppurative profonde

Il s'agit des infections des tissus mous comme la staphylococcie maligne (Fig.04) (Robert, 2013) ou bien autre infection profonde qui peut provoquer des septicémies, pneumopathie (Géraldine, 2009).



Figure 04. Staphylococcie du visage après manipulation (Robert, 2013).

I. 6.2. Toxémie staphylococcique

C'est une infection toxique causée par la sécrétion des toxines ou bien par ingestion d'une toxine dans un aliment contaminé (Géraldine, 2009) ; ce type d'infection est caractérisé par le choc toxique staphylococcique (TSS) (Ouidiri et Houari, 2015).

I.7. Résistance aux antibiotiques**I. 7. 1. Définition de la résistance**

La résistance bactérienne est la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques qui sont censés les tuer ou les contrôler.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Aujourd'hui, souvent d'origine synthétique et produits par l'homme, les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se "défendre" contre les autres bactéries. Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps les moyens de s'en protéger. Il s'agit là de résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewski et al., 2010).

I.7. 2. Modes d'émergence de la résistance bactérienne**I.7. 2.1. Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes (Lozniewski et al., 2010).

I.7. 2.2. Résistance acquise :

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne que quelques ou parfois de nombreuses souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien.

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski et al., 2010).

I.7. 2.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs gonophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie

peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un à pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique et l'autre à pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (Lozniewski et al., 2010).

I.7. 2.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise

1. Diminution de la perméabilité et efflux actif

L'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal ; cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (Lozniewski et all,2010).

2. Modification de la cible des antibiotiques :

La Synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêta-lactamines : pour *Staphylococcus aureus*, l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène *mecA*, d'origine mal connue, induit la synthèse d'une nouvelle PLP, la PLP2a qui est capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et confère une résistance à toutes les bêta-lactamines (Lozniewski et all,2010).

3. Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

Certaines bactéries sécrètent des enzymes, spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques, capables d'inactiver ou de détruire l'antibiotique. L'interaction de l'antibiotique avec sa cible est alors supprimée. C'est un mode de résistance très fréquent qui touche essentiellement la famille des bêta-lactamines grâce à la production de bêta-lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables (Touaitia, 2016 ; Adel et Talbi, 2017).

La première observation de résistance par production de pénicillinase date de 1942. Actuellement, plus de 90% des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G par ce mécanisme (Haroun et Madi, 2012). La production d'une pénicillinase plasmidique, inductible, inactive les pénicillines A et G, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Les pénicillines M et les céphalosporines ne sont pas inactivées par cette pénicillinase (Touaitia, 2016).

I.7.3. Résistance de *S.aureus* aux antibiotiques

I. 7.3.1. Résistance aux bêtalactamines

La famille des bêtalactamines comprend plusieurs classes d'antibiotiques : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les pénèmés (hybrides entre les

pénicillines et les céphalosporines). Ces antibiotiques ont tous une structure en commun: le noyau bêta-Lactame (Fig.05) (Robert, 2013).

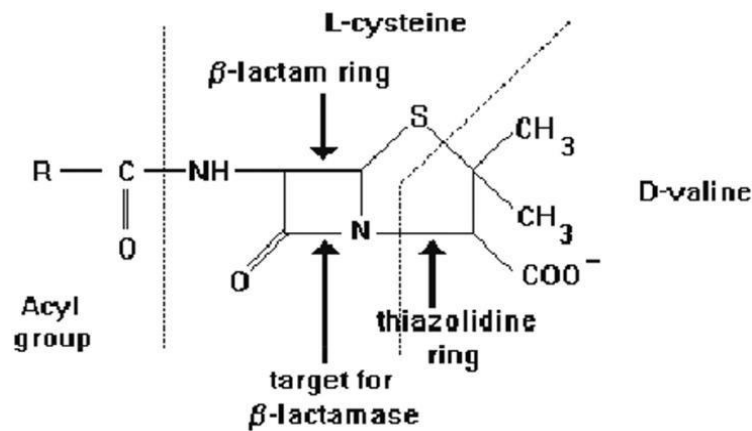


Figure 05 : Structure du noyau bêta-Lactame (Matthieu, 2007)

Les β -lactamines agissent sur la paroi bactérienne, plus précisément sur les protéines lient la pénicilline (PLP). Les PLP sont des protéines à activité enzymatique (transglycosylases, carboxypeptidases et essentiellement des transpeptidases) impliquées dans la synthèse et la réticulation de la paroi et sont situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Thibaut et al., 2006 ; Tchougoune, 2007).

Les unités structurales de la paroi sont reliées entre-elles à l'extérieur de la membrane cytoplasmique par un groupe d'enzymes membranaires appelées transpeptidases. Le N-acétyl muramique est modifié par un pentapeptide qui se termine par deux résidus de D-alanine.

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines présentent une parenté structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala constitutif de la paroi, ils forment un lien covalent avec l'enzyme membranaire et empêchent donc toute activité de celui-ci (Angandza, 2012 ; Robert, 2013).

Cette fixation covalente entre les PLP et les β -lactamines induit un blocage des réactions de transglycosylation et transpeptidation et donc l'arrêt de la croissance bactérienne. La liaison des bêta-lactamines aux PLP et l'arrêt de la croissance bactérienne qui s'en suit ne suffisent pas à engendrer la mort cellulaire. La bactéricide des β -lactamines résulte de l'activation d'enzymes lytiques bactériennes (autolysines) suite à l'altération du peptidoglycane (Angandza, 2012 ; Robert, 2013).

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes :

1. Résistance par production de β -lactamases

Une β -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines ; les rendant inactives. L'existence d'une pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline, etc.), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline)(**Angandza, 2012**).

Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *S.aureus*. Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases de staphylocoque peut être porté soit par un transposon soit être chromosomique. La production de β -lactamases peut être constitutive ou le plus souvent inductible. L'activité des β -lactamines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamases de type acide clavulanique, tazobactam ou sulbactam (**Angandza, 2012**).

2. Résistance par modification de la cible

Les PLP sont des protéines possédant une affinité pour les β -lactamines (**Tchougoune, 2007**).La résistance se fait par altération de la cible de l'antibiotique avec diminution de l'affinité pour les β -lactamines.

I.7.3. 2. Résistance à la méthicilline

La méthicilline comme l'oxacilline et la cloxacilline, est une pénicilline M non hydrolysée par les pénicillinases. La résistance à la méthicilline est principalement due à la production d'une nouvelle PLP, la PLP2a ayant une affinité diminuée pour les bêta-lactamines. Cette PLP2a est une transpeptidase qui peut catalyser à elle seule l'assemblage du peptidoglycane lorsque les autres PLP sont saturées par les bêta-lactamines. Support génétique. La PLP2a est codée par le gène *mecA* situé dans un grand fragment d'ADN chromosomique appelé *mecDNA*, retrouvé uniquement chez les souches résistantes à la méthicilline et intégré au niveau d'un site spécifique de *S. aureus* (**Boyer et Jehl, 2020**).

I. 7.3.3. Résistance aux tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre d'action ; cette famille est composée de molécules naturelles produites par *Streptomyces* telles que la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la tétracycline et d'autres semi synthétiques, comme la doxycycline et la minocycline (**Tchougoune, 2007**).

Les tétracyclines traversent la membrane externe de la cellule bactérienne par diffusion passive pour être ensuite acheminés par un mécanisme de transport actif à travers la membrane cellulaire interne une fois à l'intérieur de la bactérie, les tétracyclines se lient de

façon réversible à la sous unité 30S ribosomale et inhibent la synthèse protéique en empêchant l'association de l'ARN amino-acyltransférase avec le ribosome au niveau du site accepteur du complexe ARNm-ribosome (**Tchougoune, 2007**).

La résistance entraîne une protection des sites actifs du ribosome par des protéines Tet. La protéine Tet K est une des protéines qui entraîne l'expulsion des tétracyclines et les protéines Tet O ou Tet M protègent les sites actifs ribosomiaux (**Angandza, 2012**).

I. 7.3.4. Résistance aux sulfamides

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques mais leur association avec le triméthoprime rend leur activité bactéricide, les deux molécules agissant en synergie (**Robert, 2013**). Ils inhibent la synthèse des folates indispensables à la croissance bactérienne. (**Tchougoune, 2007**).

Les dihydrofolates sont synthétisés à partir de l'acide para-amino benzoïque (PABA) grâce à l'action de la dihydroptéroate synthétase (DHPS). Les sulfamides entrent en compétition avec PABA car ils ont une structure moléculaire analogue. La résistance à cette classe d'antibiotique peut être due à une imperméabilité aux antibiotiques d'origine chromosomique ou plasmidique, une augmentation significative de DHPS et de PABA par hyperproduction (**Tchougoune, 2007**).

I. 7.3.5. Résistance aux aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides qui agissent sur la traduction des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et la synthèse des protéines.

Après avoir pénétré de façon passive dans la bactérie, ils sont transportés vers les ribosomes et interfèrent ainsi avec la sous-unité 30S des ribosomes qui joue un rôle dans la synthèse peptidique en lisant l'ARNm (**Tchougoune, 2007**), ce qui entraîne soit une inhibition de l'étape d'élongation des protéines (rupture des polysomes en monosomes), soit l'induction des erreurs de la traduction de l'ARNm qui conduit à la synthèse de protéines anormales dites protéines « non-sens ». Ces deux effets associés sont à l'origine de leur effet bactéricide (perturbation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique).

Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmiques ou transposables (**Tchougoune, 2007**).

S. aureus résiste à ces antibiotiques par production d'enzymes modificatrices d'aminoside. On retrouve 3 classes selon la réaction catalysée:

- Production d'une acetyltransférase responsable de l'acétylation du groupement NH₂ ;
- Production d'une phosphotransférase réalisant la phosphorylation du groupement-OH ;
- Production d'une nucleotidyltransférase responsable d'une nucléotidylation du groupement-OH (**Angandza, 2012**).

I. 7.3. 6. Résistance aux macrolides

Les macrolides constituent une famille homogène dont le nombre de représentants est limité. Ce sont des antibiotiques naturels et hémisynthétiques obtenus par fermentation de *Streptomyces*, l'érythromycine est la molécule de référence extraite de *Streptomyces erythreus* en 1952.

Les macrolides ont une activité bactériostatique sur les staphylocoques ; seules les streptogramines association de deux composés agissant en synergie ont une activité bactéricide (**Angandza, 2012**)

Ces antibiotiques se fixent sur la fraction 50S des ribosomes au niveau du site P et inhibent ainsi la synthèse protéique. Cette interaction induit un blocage du complexe aminoacyl-ARNt et les acides aminés apportés par l'ARN de transfert ne s'incorporent plus aux chaînes polypeptidiques. La synthèse protéique ne pouvant plus se réaliser, la survie de la bactérie est compromise.

Les mécanismes de résistances aux macrolides (érythromycine, spiramycine), lincosamides (clindamycine) et streptogramines (pristinamycine) comprennent la modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices (**Angandza, 2012 ; Robert, 2013**).

I. 7.4. Multi-résistance bactérienne

Il s'agit d'une terminologie très couramment utilisée même si elle ne répond pas à une définition univoque. Il est d'usage de parler de multi-résistance face à une bactérie qui du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique" ou face à une bactérie sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques.

La multi-résistance peut donc être acquise, mais aussi naturelle. Au total ; ce terme s'emploie généralement pour une bactérie qui pose en général un problème de ressource thérapeutique (**Lozniewski et al., 2010**).

Aujourd'hui ; l'émergence et la diffusion dans les populations humaines de bactéries ayant peu à peu acquis des résistances aux antibiotiques ; ils sont devenues des problèmes de santé publique préoccupants.

Les antibiotiques administrés à des individus dans un souci de bénéfice individuel ont un impact sur la collectivité par l'activité antibactérienne qu'ils exercent sur les écosystèmes. Ainsi que l'évolution de la résistance bactérienne acquise aux antibiotiques se concrétise aujourd'hui par des taux élevés de multi-résistance de certaines espèces bactériennes qui étaient sensibles "à l'origine", espèces plutôt impliquées dans les infections acquises à l'hôpital comme *Staphylococcus aureus* mais aussi espèces bactériennes plutôt responsables d'infections communautaires comme *Streptococcus pneumoniae*.

La progression de cette multi-résistance conjuguée à l'absence de réelles perspectives de découverte de nouveaux antibiotiques dans les prochaines années risque de conduire à une augmentation de la létalité de certaines infections bactériennes et représente donc une menace réelle pour l'avenir (**Lozniewski et al, 2010**).

Chapitre II:

Le thym et les composés phénoliques

Généralités sr le thym

II.1. Définition

Le terme « Thym » est apparue au XIII^{ème} siècle ; il provient du mot grec « Thymos » ce qui signifie « Fumée» et « le courage » (Mebarki, 2010), ou du latin « Thymus » c'est à dire « parfumé » en raison de son agréable odeur (Boukerrouche, 2018).

Le thym est une plante aromatique très répandue en Algérie (Haddouch et al., 2009), elle est utilisée depuis l'antiquité en médecine traditionnelle grâce à ses activités biologiques.

II.2. Taxonomie

Règne : végétal.

Embranchement : Spermaphyte.

Sous-embranchement : Maliophytes

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Lamiale.

Famille : *Lamiaceae*.

Genre : *Thymus*.

Espèce : *Thymus fontanesii* (Ouandjeli, 2016).

II. 3. Description botanique

Les *thymus* sont des plantes basses sous ligneuses qui forment des touffes bien étalées et ramifiées pouvant atteint 40cm de hauteur.

Thymus fantanesii pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues. ; Cette espèce est constituée d'une tige ligneuse portant de nombreuses feuilles colorées en vert foncé, recourbées sur les bords (Fig 06) et sont recouvertes de poils et de glandes riches en huiles essentielles ; appelées trichomes (Iserin et al., 2001). Les fleurs sont réunies en grappe avec une couleur violet ou blanchâtre et parfois rose (Mebarki, 2010).



Figure 06 : Plante de *Thymus fontanesii* (Ouandjeli, 2016)

II. 4. Répartition géographique

Le thymus est une plante très répandue dans le nord-ouest Africain (Algérie, Maroc, Tunisie et Libye) (Aomari et Sehaki, 2018). Il existe presque 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. Il pousse sur les montagnes d'Ethiopie et l'Arabie du sud-ouest (Mebarki, 2010).

En Algérie, le thym comprend plusieurs espèces réparties sur tout le littoral et aussi dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Mebarki, 2010).

Thymus fontanesii est une espèce qui se localise dans le Tell endémique Est-Algérie-Tunisie (Touhami, 2017).

II. 5. Propriétés de *Thymus fontanesii*

II.5.1. Propriétés thérapeutiques

Thymus fontanesii est une plante aromatique qui est utilisée en thérapeutique grâce à ses propriétés pharmacologiques (antispasmodique, antiseptique et antitussif) (Touhami, 2017).

Cette plante est considérée comme un traitement efficace contre le rhume, l'angine et la grippe et diminue aussi les sécrétions nasales, elle est aussi utilisée dans le cas des problèmes intestinaux, les infections pulmonaires, les infections urinaire, l'hypertension et même en usage externe pour la cicatrisation des plaies (Aomari et Sehaki, 2018).

II. 5. 2. Propriétés industrielles

Le thym est utilisé dans les préparations alimentaires pour la saveur et pour empêcher la contamination alimentaire (Mebarki, 2010). Il est aussi utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage (Boukerrouche, 2018).

II. 6. Généralités sur les composés phénoliques

II. 6. 1. Définition

Les composés phénoliques sont des molécules du métabolisme secondaire spécifique du règne végétal ; ils sont caractérisés par la présence du noyau phénolique à 6 carbones portant le groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (ester, éther...) (Bessedik et Benikhlef, 2017).

II. 6. 2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont synthétisés par deux voies :

a. Voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine.

La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes ; permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec la coenzyme a permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques :

- **Les acides de la série benzoïque** (acides gallique, protocatéchique...) par β -oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques).
- **Les esters de type chlorogénique** par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...).
- **les coumarines**, par cyclisation interne des molécules suivie de modification complémentaires (glycosylation, prénylations...).
- **les lignines** par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases (**Djafar et Rebbouh, 2016**).

b. Voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine (**Djafar et Rebbouh, 2016**).

II. 6. 3. Classification

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. Ces molécules sont généralement conjuguées à d'autres molécules (glucides, lipides et acides organiques) (**Djafar et Rebbouh, 2016**).

1. **Acides phénoliques** : ils sont contenus de nombreuses plantes agricoles et médicinales, ils se divisent en :
 - Acides hydroxycinnamiques
 - Acides hydroxybenzoïques (**Khelfallah, 2013**).
2. **Flavonoïdes** : ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, fruits et feuilles ; ils se subdivisent en plusieurs classes :
 - Flavones et flavonals.
 - Flavonones.
 - Chalcone.
 - Isoflavones(**Touhami, 2017**).

3. **Tanins** : ce sont des composés phénoliques solubles dans l'eau avec une masse molaire entre 500 et 3000 daltons et ils sont classés en fonction de leurs structures et leurs propriétés en tanins hydrolysables et tanins condensés (**Touhami, 2017**).
4. **Coumarines** : ils sont connus pour l'utilisation dans l'industrie des cosmétiques comme additifs, dans l'industrie pharmaceutique et agrochimique (**Touhami, 2017**).
5. **Quinones** : substances brillantes et colorées (couleur rouge, jaune ou orangé), caractérisées par la présence de deux groupements carbonyles (**Touhami, 2017**).

II. 6. 4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont dotés de nombreuses propriétés physiologiques leur permettant d'exercer des activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépa-toprotective, antimicrobienne, anti-cancérogène et cardioprotective (**Djafar et Rebbouh, 2016**).

Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est dû à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par neutralisation des radicaux libres, par piégeage de l'oxygène ou par décomposition des peroxydes (**Nijveldt et al, 2001**).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent plusieurs domaines: l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique, la phytothérapie et la santé (**Leong et Shui, 2002**).

- **Dans l'industrie alimentaire**, ils assurent une meilleure conservation des denrées grâce à leur activité anti-oxydante qui empêche la peroxydation lipidique.
- **Dans l'industrie cosmétique**, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau.
- **En phytothérapie**, en plus des propriétés vasculo-protectrices des flavonoïdes, chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Djafar et Rebbouh, 2016**).

II.6.5. Activités des composés phénoliques

II. 6. 5. 1. Activités thérapeutiques

Dans le domaine de la santé, les flavonoïdes empêchent les dommages oxydatifs par différents mécanismes: soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxy et peroxydes, soit par chélation du fer et du cuivre qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires, soit par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres.

Ils jouent aussi un rôle très important dans le traitement de plusieurs maladies telles que le diabète, la goutte, des inflammations, des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension, des thromboses, des allergies et de certaines infections bactériennes et virales.

Les tannins sont dotés d'un pouvoir astringent, ce qui explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques.

Les composés possédant les activités antioxydants et antiradicalaires sont représentés principalement par les acides phénoliques, en particulier l'acide gallique qui réduisait la viabilité des cellules cancéreuses du poumon dans une étude *in vivo* menée chez la souris (Elkharrez et al., 2015).

II. 6. 5. 2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis à vis des microorganismes dont le mécanisme peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions inactivant les andésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires, ce qui entraîne la déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rend perméable.

L'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (Daglia, 2012).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre III :

Matériel et Méthodes

III.1. Objectif du travail

Le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de *Thymus fontanesii* par des tests de sensibilité *in-vitro* vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires multi-résistantes isolées chez des patients souffrant d'infections génitales ou urinaires.

III.2. Lieu et durée de l'étude

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Technologie Alimentaire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et le laboratoire de microbiologie de l'institut des Science Vétérinaires pendant une période de 21 jours (15 février au 8 Mars 2020).

III.3. Matériel

III.3.1. Matériel végétal

Thymus fontanesii a été récolté durant le mois de Mai 2019 dans la région d'El-Guebab, wilaya de Tiaret. Nous n'avons pas pu utiliser une plante fraîchement récoltée à cause de la situation sanitaire actuelle que traverse notre pays (COVID 19).

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée par Dr AIT HAMMOU, département d'Agronomie, Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Tiaret.

Les feuilles ont été nettoyées, lavées à l'eau de robinet puis séchées à l'air libre ; à l'abri de la lumière et de l'humidité. Après séchage, les feuilles ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique et conservées dans des bocaux en verre jusqu'à extraction



Figure 07. Matériel végétal utilisé dans l'étude.

III.3.2. Matériel biologique

Au total, quatre (04) souches de *S. aureus* ont fait l’objet de cette étude. Il s’agit de trois (03) souches isolées à partir de prélèvements urinaires et vaginaux fournis gracieusement par un Laboratoire d’analyses médicales privé situé dans la wilaya de Tiaret.

Une souche de collection internationale a été utilisée comme contrôle. Il s’agit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fourni aimablement par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire, Université Jordanienne des Sciences et Technologie.

III.3.3. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire et les produits nécessaires à la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 01 : Matériel de laboratoire et produits utilisés

Appareillage, verrerie et instruments	Produits	Milieux de culture
- Agitateur magnétique (VELP scientifica).	- Peroxyde d’hydrogène	- Gélose nutritive
- Vortex (Dragon Lab)	- Eau physiologique	- Milieu de Chapman
- Autoclave (DSX-280B)	- Ethanol pur	- Gélose Mueller-Hinton
- Bain marie (GFL)	- Méthanol pur	
- Balance de précision (Sauter RE2021)	- Violet de gentiane	
- Broyeur électrique	- Lugol	
- Evaporateur rotatif (HEIDOLPH, W60)	- Fuschine	
- Spectrophotomètre (Pharmacia Biotech)	- VP1 et VP2	
- Etuve (Mettler)	-Zym A et Zym B	
- Microscope photonique (Optika)	-Nit 1 et Nit 2	
- Ballons, béchers, entonnoirs		
- Boîtes de Pétri, lames, tubes à essai		
- Eprouvettes graduées, Fioles jaugées		
- Pipettes graduées, Pipettes pasteur		
- Cuves spectrophotométriques		
- Micropipettes		
- Ecouvillons stériles		
- Pincettes métalliques		

N.B : la composition des milieux de culture est donnée dans l’Annexe 01.

III. 4. Méthodes

La démarche expérimentale globale est illustrée dans l'organigramme ci-dessous (Fig. 08)

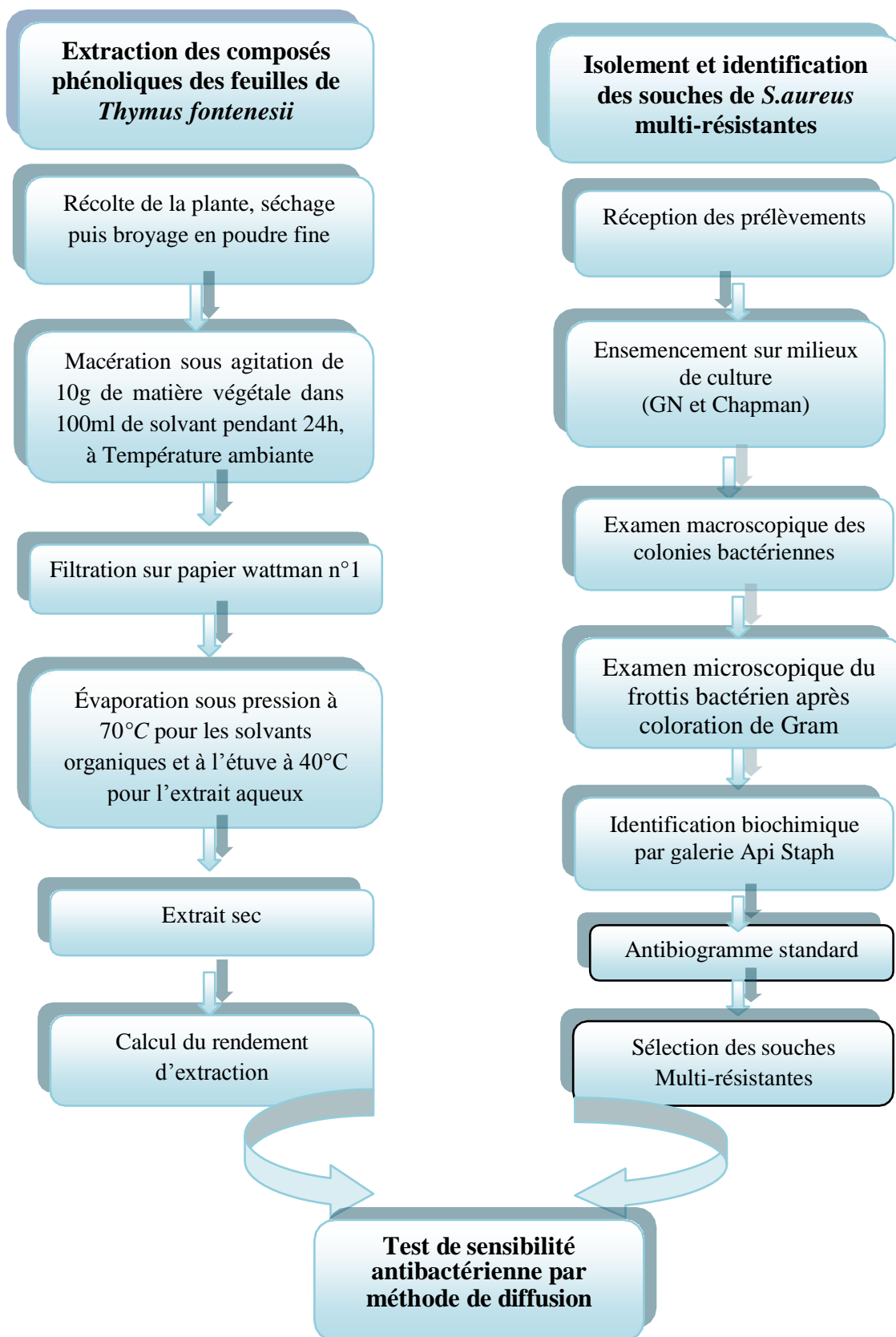


Figure 08. Organigramme du protocole expérimental

III.4.1. Extraction des composés phénoliques

Le méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération dans l'eau et les solvants organiques méthanol et éthanol (Brzowska et al., 1973).

➤ Principe

Le principe consiste à ce que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide/liquide, dissoudre le composé actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur. L'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté se fait par dialyse ou par diffusion (Ben Ammar, 2008).

➤ Technique

Dix (10) grammes de la poudre végétale ont été additionnées à 100 ml de solvant (méthanol, éthanol ou eau distillée). Après une agitation continue pendant 24h à température ambiante et à l'obscurité, une filtration a été faite sur papier Wattman n°1. Les filtrats ainsi obtenus ont été évaporés à sec à l'étuve pour l'extrait aqueux ou par un évaporateur rotatif à 70° C pour les extraits organiques.

L'extrait sec a été solubilisé conservé dans des flacons opaques et à température ambiante (Zerroug et al., 2011).

III.4.1.1. Calcul du rendement d'extraction

Le poids en extrait sec, a été calculé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant) et le ballon vide.

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage. Il est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P_F/P_I) \times 100$$

Où :

R : Rendement en pourcentage

P_F : Poids de l'extrait sec

P_I : Poids de la poudre mise à l'extraction (Zerroug et al., 2011).

III.4.2. Evaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques

III.4.2.1. Culture

Neuf (09) prélèvements cliniques dont sept (07) vaginaux, un (01) urinaire et un (01) prélèvement de pus ont étéensemencés sur deux milieux de culture : un milieu ordinaire (Gélose nutritive) et un milieu sélectif (milieu de Chapman). La souche de référence (*S.aureus* ATCC 6538) conservée dans le glycérol à -20°C a été repiquée sur milieu de Chapman. Les boites de pétri ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

III.4.2.2. Identification bactérienne

III.4.2.2. 1.Examen macroscopique

Les colonies bactériennes ont été examinées macroscopiquement afin de déterminer leur forme, taille, couleur et d'autres caractères.

III.4.2.2. 2.Examen microscopique

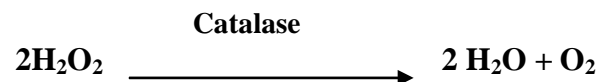
Afin de déterminer la forme des bactéries et la nature de leur paroi (Gram positif ou Gram négatif), un frottis bactérien a été préparé à partir de chaque souche puis coloré par la coloration de Gram (**Annexe 02**) et examiné enfin sous microscope au grossissement (100X).

III.4.2.2.3. Examen biochimique

1. Test de la catalase

➤ Principe

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



➤ Technique

Une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur a été émulsionnée dans une goutte d'eau oxygénée à 3% préalablement déposée sur une lame propre. Une réaction positive se traduit par la formation immédiate de bulles de gaz, par contre l'absence de bulles indique un résultat négatif (**Marchal et al., 1982**).

2. Identification biochimique des isolats cliniques par galerie Api Staph

Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* (Coques à gram+, catalase+) ont fait l'objet d'une identification biochimique par galerie Api Staph afin de déterminer l'espèce bactérienne.

➤ Principe

La galerie Api Staph est un système standardisé pour l'identification du genre *Staphylococcus*. Elle comprend des tests biochimiques miniaturisés et se présente sous forme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests sont reconstitués en inoculant les microtubes avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph medium.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à

l'aide du tableau de lecture figurant dans la fiche technique et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

➤ **Technique**

Avant de retirer la galerie de son emballage, les alvéoles présentes dans le fond de la boîte ont été remplies d'une faible quantité d'eau distillée afin de créer une atmosphère humide. La galerie a été placée ensuite dans le fond de la boîte.

La galerie a été ensuite inoculée par une suspension bactérienne préparée à l'échelle 0.5 McFarland en remplissant soit les micotubes uniquement, soit les microtubes et les cupules pour les tests encadrés ou en ajoutant l'huile de paraffine dans les cupules pour les tests soulignés exigeant l'anaérobiose.

L'incubation de la galerie a été réalisée à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Lecture et identification**

Après incubation, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau de lecture (**Annexe 03**) et l'identification du profil numérique a été faite à l'aide d'un logiciel.

III.4.2. 3. Activité antibactérienne

III.4.2.3.1. Antibiogramme standard

Après identification bactérienne, seules les souches de *Staphylococcus aureus* ont fait l'objet d'un test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard) selon la technique préconisée par le CLSI (2006).

a. Préparation et standardisation des suspensions bactériennes

Une suspension bactérienne de chaque souche à tester est préparée à partir d'une culture jeune de 18 heures : des colonies isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et placées dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension ainsi obtenue est ajustée à l'échelle 0.5 McFarland par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

b. Ensemencement des boîtes

Les suspensions bactériennes obtenues sont étalées par écouvillonnage à la surface de la gélose Mueller-Hinton coulée sur une épaisseur de 4 mm dans des boîtes de pétri de 90 mm.

c. Application des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée avec une suspension bactérienne de chaque souche étudiée.

Nous avons utilisé les antibiotiques suivants: Penicilline (**P¹⁰**), Oxacilline (**OX⁵**), Cefoxitine (**FOX³⁰**), Gentamicine (**CN¹⁰**), Amikacine (**AK³⁰**), Kanamycine (**K³⁰**), Vancomycine (**VA³⁰**), Chloramphénicol (**C³⁰**), Erythromycine (**E¹⁵**), Tétracycline (**T³⁰**) et Sulfaméthoxazole-Triméthoprime (**SXT²⁵**),

Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures et après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés puis interprétés en se référant à la table de lecture de l'antibiogramme (**Annexe 03**).

III.4.2. 3.2. Activité antibactérienne des extraits phénoliques

Afin d'évaluer l'effet antibactérien des extraits des feuilles de *T. fontanesii*, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé.

➤ Technique

Un inoculum bactérien préparé à partir d'une culture jeune puis standardisé au standard McFarland 0.5 est ensemencé par écouvillonnage à la surface de la gélose Müller-Hinton. Des disques en papier filtre de 6mm de diamètre ont été stérilisés puis imprégnés de 20µl de chaque extrait et déposés ensuite à la surface des géloses préalablement ensemencées.

Pour chaque extrait, le screening antibactérien a été effectué avec quatre concentrations préparées dans l'eau physiologique stérile : 62,5mg/ml, 31,25mg/ml, 15,62mg/ml et 7,81mg/ml. Les boîtes ont été ensuite fermées et laissées pendant 15 minutes pour une pré-diffusion à température ambiante avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h.

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Adesokan et al., 2007**).

Chapitre IV :

Résultats et discussion

IV. 1. Extraction des composés phénoliques

IV.1.1. Rendement d'extraction

Les rendements obtenus après l'extraction des composés phénoliques totaux des feuilles de *Thymus fontanesii* en utilisant l'eau distillée et deux solvants organiques sont représentés dans la figure 09. Ils sont exprimés en pourcentage massique.

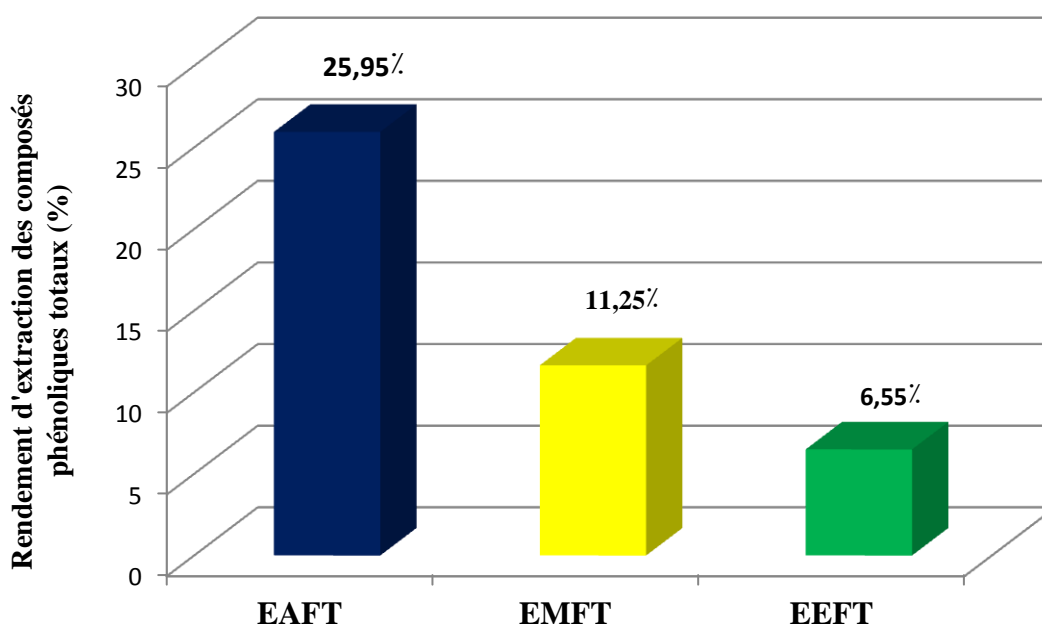


Figure 09. Rendement d'extraction des composés polyphénoliques des feuilles de *Thymus fontanesii* pour les trois solvants

Le calcul des rendements en extraits secs par rapport au poids total du broyat montre que l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé (25,95%), suivi par l'extrait méthanolique (11,25%) et l'extrait éthanolique (6,55%).

Contrairement à nos résultats, **Boukerouche (2018)** a rapporté un rendement plus élevé pour l'extrait méthanolique de *T. fontanesii* Boiss et Reut (14,99%) et un rendement très faible pour l'extrait aqueux (4,30%).

De même, le rendement que nous avons enregistré pour l'extrait méthanolique de *T. fontanesii* est nettement inférieur ($28,14 \pm 1,9\%$) à celui obtenu par **Noui (2017)** qui a utilisé la méthode d'extraction par soxhlet.

Nos résultats corroborent en partie ceux obtenus par **Yakhlef (2010)** qui a observé que l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* a donné le meilleur rendement (20,05%) suivi par

L'extrait méthanolique (6,24%). Cependant, ces rendements restent inférieurs à ceux que nous avons obtenus avec les mêmes solvants.

Les divergences observées entre les différentes études peuvent être particulièrement attribuées à la méthode d'extraction utilisée, les conditions expérimentales dans lesquelles l'extraction a été effectuée et le type de solvant utilisé car il y'a une affinité entre le solvant et les composés extraits (**Ghasemzadeh et al., 2011**).

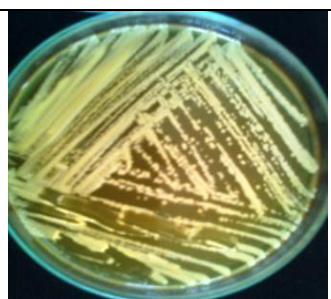
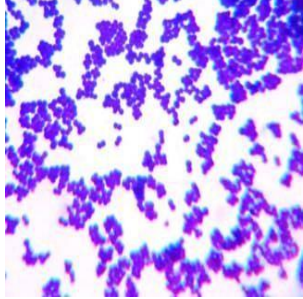

IV.2. Activité antibactérienne

IV.2.1. Identification des isolats cliniques

L'identification bactérienne des neuf isolats cliniques a permis de mettre en évidence la présence d'une (01) souche d'*Escherichia coli*, une (01) souche de *Bacillus sp*, quatre souches de staphylocoques blancs (*S.xylosus* (02), *S.epidermidis* (01) et *S.haemolyticus* (01)) et trois (03) souches de *S. aureus* dont deux (02) d'origine vaginale et une (01) d'origine urinaire.

Les résultats des tests de pré-identification des staphylocoques sont présentés dans le tableau 02.

Tableau 02 : Tests de pré-identification des souches de *Stapylococcus*

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Test de la catalase
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonies arrondies, brillantes, à bords réguliers, bombées, jaunes doré sur le milieu de chapman	Coques à gram positif, groupés en amas sous forme de grappe de raisin	Positive
			

Le résultat de l'identification biochimique des souches de *Staphylococcus aureus* par galerie Api Staph est illustré dans l'**annexe 05**.

IV.2.2. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard)

Les résultats relatifs à l'étude de la sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques sont résumés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques.

Classe	Antibiotique	<i>S.aureus</i> 1 (vaginale)	<i>S.aureus</i> 2 (vaginale)	<i>S.aureus</i> 3 (urinaire)	<i>S.aureus</i> ATCC6538
Betalactamines	P ₁₀	R	R	R	S
	FOX ₃₀	S	R	S	S
	OX ₅	S	R	R	S
Aminosides	CN ₁₀	S	S	S	S
	AK ₃₀	S	R	S	S
	K ₃₀	R	R	R	R
Glycopeptides	VA ₃₀	S	S	S	S
Macrolides	E ₁₅	R	I	R	S
Tétracyclines	TE ₃₀	R	R	R	S
Phénicolés	C ₃₀	S	S	S	S
Sulfamides	SXT ₂₅	S	R	R	R

S: sensible, R: résistante, I: intermédiaire.

P₁₀ :Penicilline, OX₅ : Oxacilline ; FOX₃₀ :Cefoxitine, CN₁₀:Gentamicine, AK₃:Amikacine
 K₃₀:Kanamycine, VA₃₀:Vancomycine, C₃₀:Chloramphénicol, E₁₅ :Erythromycine,
 T₃₀ :Tétracycline, SXT₂₅ : Sulfaméthoxazole-Triméthoprime.

Les résultats du tableau 03 montrent une multirésistance de tous les isolats cliniques de *S.aureus* à des d'antibiotiques appartenant à au moins quatre classes d'antibiotiques différentes. En effet, toutes les souches étaient résistantes à des antibiotiques de la classe des Bétalactamines, Aminosides et tétracyclines. De plus, toutes les souches ont montré une résistance vis-à-vis des antibiotiques appartenant soit à la classe des macrolides (résistance de *S.aureus* 1 à l'erythromycine), soit à la classe des sulfamides (résistance de *S.aureus* 2 au sulfaméthoxazole-triméthoprime), soit aux macrolides et sulfamides (*S.aureus* 3). La souche de référence était sensible à tous les antibiotiques testés à l'exception de la kanamycine et le sulfamide.

IV.2.3. Effet antibactérien des extraits de *Thymus fontanesii*

Les données relatives à la sensibilité des souches multi-résistantes de *S.aureus* aux extraits phénoliques de *T. fontanesii* sont résumées dans le tableau 04

Tableau 04 : Diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) induites par les extraits phénoliques des feuilles de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches de *S. aureus* multi-résistantes

Extrait	Concentration (mg/ml)	<i>S.aureus</i> 1 (vaginale)	<i>S.aureus</i> 2 (vaginale)	<i>S.aureus</i> 3 (urinaire)	<i>S.aureus</i> ATCC6538
Extrait méthanolique	62,5	18,5±1,91	15±1,41	15,5±0,70	19,5±0,70
	31,25	15±1,41	9±1,41	11,5±0,70	14,5±0,70
	15,62	11,5±2,12	7,5±0,70	8,5±0,70	9,5±0,70
	7,81	7,5±0,70	6±0,00	7±0,00	7±0,00
Extrait éthanolique	62,5	19,6±2,51	21,5±0,70	22,5±0,70	32,5±3,53
	31,25	15,5±0,70	17,5±0,70	17,5±2,12	23±2,82
	15,62	12,5±0,70	13,5±2,12	12,5±0,70	16±1,41
	7,81	8,5±2,12	9,5±2,12	10,5±0,70	13±00
Extrait aqueux	62,50	14,3± 1,54	14±1,41	9±0,0	13,5±0,57
	31,25	12,5±0,70	11±0,00	7,5±0,5	7±0,0
	15,62	8,5±2,12	6,5±0,70	6±0,00	6±0,00
	7,81	6,5±4,94	6±0,00	6±0,00	6±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne± écart type

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques des feuilles de *Thymus fontanesii* par la méthode des disques sur milieu gélosé a montré un effet inhibiteur contre toutes les souches étudiées. Cependant, l'effet antibactérien observé diffère d'une souche à une autre pour le même extrait et à la même concentration et d'un extrait à l'autre pour la même souche.

Les résultats du tableau 04 montrent un effet inhibiteur dose-dépendant c'est-à-dire plus la concentration de l'extrait diminue, plus le diamètre de la zone d'inhibition diminue (**Annexes 6, 7 et 8**).

Les extraits éthanolique et méthanolique ont montré une activité antibactérienne plus puissante que l'extrait aqueux vis-à-vis de toutes les souches testées y compris la souche de référence.

L'extrait éthanolique a montré une activité antibactérienne très puissante contre tous les isolats cliniques de *S. aureus* avec des diamètres d'inhibition variant de $12,5 \pm 0,70$ à $21,5 \pm 0,70$ mm pour les deux souches d'origine vaginale et des diamètres allant de $10,5 \pm 0,70$ à $22,5 \pm 0,70$ mm pour la souche d'origine urinaire. Par ailleurs, la souche de référence était extrêmement sensible à cet extrait à toutes les concentrations utilisées avec des zones d'inhibition allant de $13 \pm 0,00$ à $32,5 \pm 3,53$ mm. L'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des feuilles de *T. fontanesii* contre les isolats cliniques était supérieur à l'effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *T. capitatus* contre *S. aureus* (**Qaralleh et al., 2009**).

La souche clinique d'origine vaginale (*S. aureus* 1) et la souche de référence (*S. aureus* ATCC 6538) étaient très sensibles à l'extrait méthanolique aux plus fortes concentrations (62,5 et 31,25 mg/ml) avec des diamètres d'inhibition allant de $14,5 \pm 0,70$ mm à $19,5 \pm 0,70$. Par contre, les deux isolats cliniques (*S. aureus* 2 et *S. aureus* 3) étaient sensibles uniquement à la plus forte concentration (62,5 mg/ml) avec des diamètres de $15 \pm 1,41$ et $15,5 \pm 0,70$ mm, respectivement. L'effet antibactérien observé contre *S. aureus* ATCC 6538 est inférieur ($19,5 \pm 0,7$ mm) à celui obtenu par **Yekhlef et al. (2011)** qui ont démontré une activité antibactérienne très puissante de l'extrait méthanolique de *T. vulgaris* contre *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition de $38 \pm 0,8$ mm.

L'extrait aqueux a exhibé une activité antibactérienne moins marquée contre les différentes souches testées. En effet, les deux souches cliniques d'origine vaginale étaient sensibles uniquement aux plus fortes concentrations (62,5 et 31,25 mg/ml). Par contre, la souche d'origine urinaire (*S. aureus* 3) était résistante à toutes les concentrations. Ainsi, la souche de collection internationale (*S. aureus* ATCC 6538) était sensible uniquement à la plus forte concentration de l'extrait avec un diamètre d'inhibition de $13,5 \pm 0,57$ mm. Ce diamètre est légèrement inférieur à celui obtenu par **Yekhlef et al. (2011)** qui ont noté un diamètre d'inhibition de $15,7 \pm 0,5$ mm de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* contre *S. aureus* ATCC 25923.

Nos résultats montrent que tous les extraits testés possèdent une activité antibactérienne sur au moins deux souches de staphylocoques multi-résistantes testées.

Cependant, plusieurs recherches se sont intéressées à l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus vulgaris* et les données concernant l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus fontanesii* ne sont pas disponibles. En effet, la plupart des études se sont focalisées sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de cette dernière (*T. fontanesii*).

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques de *T. fontanesii* est attribuée aux différents constituants chimiques présents dans ces extraits mais les variations observées entre les trois extraits peuvent être expliquées par la variation de leur composition phytochimique.

L'activité antibactérienne des polyphénols, particulièrement les flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des micro-organismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement de ponts hydrogènes avec les protéines de la paroi cellulaire ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien ou la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Zeghad, 2009).

Conclusion

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales constituent une source de nouvelle molécule à activité antimicrobienne économique accessible pour faire face à l'apparition de phénomène de résistances des bactéries aux antibiotiques. A ce propre, on s'est intéressé à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de *Thymus fontanesii*.

Trois extraits ont été préparés en utilisant la méthode de macération dans l'eau pour l'extrait aqueux et l'extraction par des solvants (éthanol et méthanol) pour les extraits organiques. Ces extraits ont été ensuite testés pour leur effet antibactérien ; par la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier ; vis-à-vis d'une souche de *S.aureus* de collection internationale et trois souches cliniques communautaires de *S. aureus* multi-résistantes, isolées chez des patients souffrant d'infections uro-génitales.

Les trois extraits ont révélé des activités antimicrobiennes variables contre les différentes souches testées. En effet, les extraits organiques des feuilles de *Thymus vulgaris* ont témoigné une forte activité inhibitrice de la croissance des isolats cliniques multi-résistants aux antibiotiques avec un pouvoir inhibiteur plus fort de l'extrait éthanolique. L'effet antibactérien de l'extrait aqueux était par contre plus faible même vis-à-vis de la souche de référence.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits a montré une variation des diamètres des zones d'inhibition en fonction de la nature et la concentration de l'extrait ainsi que la souche étudié.

La sensibilité des souches de *S.aureus* multirésistantes aux extraits éthanolique et méthanolique de *Thymus fontanesii*, suggère leur possible utilisation en thérapeutique comme alternatifs aux antibiotiques dont le spectre d'action est en réduction continue.

Ainsi dans la continuité de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées:

- ✚ Quantifier les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes dans les différents extraits.
- ✚ Identifier la composition chimique des extraits des feuilles de *Thymus fontanesii*
- ✚ Tester les extraits pour leurs propriétés antibactériennes vis-à-vis des souches nosocomiales multi-résistantes.
- ✚ Etudier le pouvoir anti-oxydant des différents extraits phénoliques de *T.fontanesii*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adel K., Talbi M. (2017).** Etude de la résistance du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline et autre d'antibiotiques. Mémoire de master. Université de Béjaia, 50p.
2. **Adesokan, A. A., Akanji, M. A., Yakubu, M. T. (2007).** Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *African journal of biotechnology*, 6(22).
3. **Angandza G. (2012).** Recherche des souches de *Staphylococcus aureus* et *pseudintermedius* résistant à la méticilline dans les muqueuses anale et nasale de chiens consultés dans les cabinets vétérinaires de Dakar (Sénégal). Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, P104.
4. **Aomari L., Sehaki C. (2018).** Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de Thym. Caractérisation et évaluation de l'activité antimicrobienne. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, P86.
5. **Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. A. Ghedira., Ghedira, K. (2008).** Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: combination with the phytochemical composition. *Drug and chemical toxicology*, 31(1), 61-80.
6. **Benmadi Z., Abida H. (2018).** Effet des extraits de *Thymus vulgaris* chez *Escherichia coli* responsable uro-génitale. Mémoire de fin d'étude. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, P77.
7. **Bentrar K., Bensnouci H. (2016).** Prévalence du portage nasal de *staphylococcus aureus* en communautaire dans la région de Tlemcen. Mémoire de master. Université Aboubekr Belkaïd, P120.
8. **Bessedik M., Benikhlef M. (2017).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques d'*Opuntia ficus indica* de Tunisie. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, P139.
9. **Boukerouche A. (2018).** Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Thymus fontanesii* Boiss et Reut. Mémoire de master. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana ; P82.
10. **Boukrif R., Boukabous S. (2019).** Étude de l'activité antibactérienne de *Thymus vulgaris*. Mémoire de master. Université Akli Mohand Oulhadj– Bouira, P88.
11. **Boutiba S. (2016).** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits de *Thymus inodorus* Desf. Mémoire de master. Université Aboubakr Belkaid Tlemcen, P68.

12. **Boyer P., Jehl F. (2020)** .Virulence bactérienne précoce : fonctions cellulaire et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë. Université de Strasbourg.
13. **Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973)**. Polyphénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12(10), 2353-2357.
14. **Clotilde C. (2015)**. Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasal par *staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie, P140.
15. **CLSI. (2006)**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 7th Ed.
16. **Cowan M M. (1999)**. Plant products as antimicrobial agents, Clinical microbiology reviews. Vol 12.
17. **Daglia M. (2012)**. Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology.23 (2), 174-181.
18. **Djafar, I., Rebbouh, F. (2016)**. Evaluation de l'effet antibactérien des extraits des graines de *Peganum harmala L.* Mémoire de Master. Université Ibn-Khaldoun de Tiaret, 50p.
19. **Djaidjai S. (2016)** .Caractérisation de la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques isolées au niveau du CHU de Sétif. Mémoire de master Université A. MIRA – Bejaia, P44
20. **Elkharraz M., Rebbouh F., Rahmai A. (2015)**.Evaluation de l'effet antibactérien et antioxydant des extrait d'écorce de quelques espèces de Citrus (*Citrus sinensis L* et *Citrus limonum L*).Mémoire de master. Université Ibn Khaldoun P55.
21. **Gaillard J L., Simonet M. (1998)**. Bactériologie bactéries des infections humaines, ISBN : 2-257-10489-7, by Flammarion in France, P 273.
22. **Géraldine D. (2009)** .Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1).Thèse de doctorat. Université de Lyon, P220.
23. **Guillaume V. (2014)**. Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse, Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse de doctorat. Université Toulouse III – Paul Sabatier, P107.
24. **Haddouchi F., Hamadi A L., Meziane A ., Benmansour A. (2009)**.Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii Boiss &*

- Reut.* ISSN 1813-548X. Université Aboubakr Belkaid Tlemcen, P 246 – 259.
25. **Haroune S., Madi N. (2012).** Etude nasal de *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline au niveau de l'hôpital d'Amizour. Mémoire de master, P23.
26. **Iserin P., Masson M, Restelline J P. , Ybert E, De Laage de Meux A, Moulard F, Zha E, De la Roque R, De la Roque O, Vican P. , Deelesalle Féat T, Biaujeaud M, Ringuet J, Bloth J et Botrel A. (2001) .** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins Ed Larousse.
27. **Khelfallah A. (2013).** Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Magister. Université Constantine I, P179.
28. **Khelifi F., Zemmouche D. (2017).** Prévalence des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases et de *staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline. Mémoire de master. Université A. MIRA – Bejaia, P75.
29. **Li, B., Webster, T. J. (2018).** Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *Journal of Orthopaedic Research*®, 36(1), 22-32.
30. **Leong, L.P., Shui, G. (2002).** An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruit in Singapore Markets. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
31. **Loznizwski A, Rabaud C ., Nancy. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, Infections associées aux soins.
32. **Marchal, L., Bourdon, J.L., Richard, C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .Ed. Doin. Paris. 45-46-66
33. **Matthieu E. (2007).** Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat. Université d'Angers, P159.
34. **Mebarki N. (2010) .**Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Mémoire de master. Université M'Hamed Bougara Boumerdas, P185.
35. **Michel F. (2005).** Bactériologie alimentaire. ISBN : 2-7178-5108-9, 49-rue hericart, 75015 paris.
36. **Nijveladat R J., Van Nood E., Van Hoorn D E C., Boelens P G., Van Norren K ., Van Leeuwen P A M. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanism of action and

- potential applicatio. American journal of clinical nutrition
37. **Noui H. (2017).** Etude phytochimique et activités biologique de *Rosmarinus officinalis L* et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth de la région de M'sila : application antifongique. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif1, P163.
 38. **Ouandjeli D. (2016).** Protection des fromages contre la souche de *Pseudomonas* par des extraits végétaux. Mémoire de master. Université A. MIRA – Bejaia, P67.
 39. **Ouidri M A., Houari H. (2015).** Dépistage du portage nasal du *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) lors de l'admission des patients à l'hôpital Frantz Fanon-Blida. Mémoire de master. Université de Blida 1, P101.
 40. **Qaralleh H N., Muayad M A., K M Khleif AT., K A Tarawneh et Althunibat O Y. (2009).** Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan. University Malaysia. vol.22, P5.
 41. **Robert D. (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de doctorat. Université Angers, P126.
 42. **Salmi S., Zenati N. (2017).** Prévalence des souches staphylococcus aureus résistantes à la méticilline dans différentes denrées alimentaires. Mémoire de master. Université A. MIRA-Bejaia, P20.
 43. **Serradj C. (2016).** Etude du portage des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline chez les animaux d'élevage. Mémoire de master. Université A. MIRA – Bejaia, P35.
 44. **Tamer A. (2016)** .Labiées des mots de tessala (wilaya de Sidi bel abbés) : histologie et phytochimie. Thèse de doctorat. Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbés, P159.
 45. **Tchougoume M L. (2007)** .Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline au CHU du Point G. Thèse de doctorat. Université de Bamako, p89.
 46. **Thibaut CB. (2016).** service d'infectiologie Chalpesléman, les betaslactamines.
 47. **Touaitia R. (2016).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : Emergence et mécanismes de résistance. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba, P154.
 48. **Touhami A. (2017)** .Etude chimique et biologique des composants des huiles essentielles de différent genres de *Thymus récoltées* dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba, P173.

Références bibliographiques

- 49. Yekhlif G. (2010)** .Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L et *Laurus nobilis* L . Magister.Université El Hadj Lakhdar-Batna, P110.
- 50. Yekhlif G., S.Larouil., L.Hambaba., M.C.Aberkan2., A.Ayachi. (2011).** Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. Doi : 10.1007/s10289-011-0641-6, p11.
- 51. Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Magister. Université Mentouri Constantine, P130.
- 52. Zerroug, M.M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Nicklin, J., (2011).** Antibacterial Activity of Extracts of *Ajuga Iva* and *Teucrium polium*: *Advances in Environmental Biology*, 5 (2): 491-495.

Annexes

Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture utilisés

Gélose nutritive (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone de gélatine.....	05
Extrait de viande.....	03
Extrait de levure	03
Chlorure de sodium	05
Agar.....	18
pH= 7.3	

Gélose Chapman (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone	10
Extrait de viande.....	01
Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Rouge de phénol.....	0.025
Agar.....	15
pH= 7.3	

Gélose Müller -Hinton (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf	2,00
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1.50
Agar.....	17.0
pH 7.4 ± 0.2.	

Annexe 02. Coloration de Gram (Singleton et Sainsbury, 1994)

1. Préparer un frottis bactérien en transférant un petit fragment d'une colonie dans une goutte d'eau déposée préalablement sur une lame de verre propre.
2. Disperser la colonie dans l'eau afin d'obtenir une suspension laiteuse.
3. Étaler la suspension sur une surface d'un à deux centimètres carrés.
4. La suspension est ensuite séchée de façon à obtenir le frottis. Ce dernier est fixé en le passant rapidement une ou deux fois dans la flamme du bec bunsen.
5. Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane pendant une minute.
6. Verser le lugol et laisser agir pendant 1 minute puis rincer à l'eau distillée.
7. Décolorer avec l'alcool à 95% en plaçant la lame dans une position oblique puis rincer à l'eau.
8. Recouvrir le frottis avec une solution de fuchsine pendant une minute puis rincer et sécher le frottis.
9. Observation microscopique à immersion (X100) : les bactéries à Gram- apparaissent roses et les bactéries à Gram+ se colorent en violet.

Annexes

Annexe 03. Table de Lecture de la galerie API Staph et profil biochimique de *Staphylococcus aureus* sur la galerie Api Staph

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULT			
				NEGATIVE	POSITIVE		
0	No substrate		Negative control	red	—		
GLU	D-glucose	1.56	(Positive control) (D-GLUcose)	red *	yellow		
FRU	D-fructose	1.4	acidification (D-FRUctose)				
MNE	D-mannose	1.4	acidification (D-ManNosE)				
MAL	D-maltose	1.4	acidification (MALTose)				
LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4	acidification (LACTose)				
TRE	D-trehalose	1.32	acidification (D-TREhalose)				
MAN	D-mannitol	1.36	acidification (D-MANnitol)				
XLT	xylitol	1.4	acidification (XyLiTol)				
MEL	D-melibiose	1.32	acidification (D-MELibiose)				
NIT	potassium nitrate	0.08	Reduction of NITrates to nitrites			NIT 1 + NIT 2 / 10 min colorless-light pink red	
PAL	β -naphthyl phosphate	0.0244	ALkaline Phosphatase			ZYM A + ZYM B / 10 min yellow violet	
VP	sodium pyruvate	1.904	Acetyl-methyl-carbinol production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless-light pink violet-pink			
RAF	D-raffinose	1.56	acidification (RAFFinose)	red	yellow		
XYL	D-xylose	1.4	acidification (XYLose)				
SAC	D-saccharose (sucrose)	1.32	acidification (SACcharose)				
MDG	methyl- α -D-glucopyranoside	1.28	acidification (Methyl- α -D-Glucopyranoside)				
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	acidification (N-Acetyl-Glucosamine)				
ADH	L-arginine	1.904	Arginine DiHydrolase	yellow	orange-red		
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red-violet		



Annexes

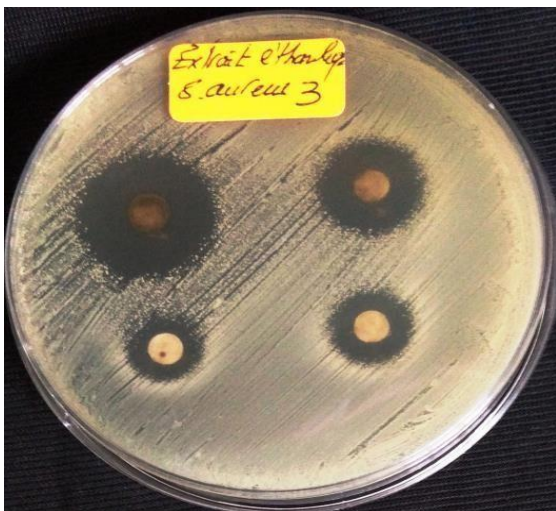
Annexe 04. Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S.aureus* étudiées



Effet de l'EEFT sur *S.aureus* 01



Effet de l'EEFT sur *S.aureus* 02



Effet de l'EEFT sur *S.aureus* 03



Effet de l'EEFT sur *S.aureus* ATCC6538

Annexes

Annexe 05. Effet de l'extrait méthanolique des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S.aureus* étudiées



Effet de l'EMFT sur *S.aureus* 01



Effet de l'EMFT sur *S.aureus* 02



Effet de l'EMFT sur *S.aureus* 03



Effet de l'EMFT sur *S.aureus* ATCC6538

Annexes

Annexe 06. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches de *S.aureus* étudiées



Effet de l'EAFT sur *S.aureus* 01



Effet de l'EAFT sur *S.aureus* 02



Effet de l'EAFT sur *S.aureus* 03



Effet de l'EAFT sur *S.aureus* ATCC6538

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches communautaires de *Staphylococcus aureus* multi-résistantes aux antibiotiques.

Le calcul du rendement en extraits secs par rapport au poids total du broyat varie en fonction du solvant utilisé. En effet, l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé (25,95%) suivi par l'extrait méthanolique (11,25%) et enfin l'extrait éthanolique (6,55%).

Ces extraits ont testés pour leur effet antibactérien possible *in vitro*, contre quatre (04) souches de *S. aureus*, en employant la méthode de diffusion à partir des disques.

Les extraits ont réagi positivement et d'une manière distincte sur l'ensemble des souches testées avec un pouvoir inhibiteur très puissant de l'extrait éthanolique.

L'effet antibactérien obtenu est un effet dose-dépendant marqué par la formation de zones d'inhibitions proportionnelles aux concentrations utilisées.

La sensibilité des souches communautaires de *S. aureus* multirésistantes aux extraits de *Thymus fontanesii*, suggère la possible utilisation de ces derniers comme traitement alternatif aux antibiotiques pour le traitement des infections uro-génitales.

Mots clés : *Thymus fontanesii*; extraits phénoliques, activité antibactérienne, *S. aureus*.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الفينولية لأوراق نبات الزعر *Thymus fontanesii* ضد السلالات المجتمعية من البكتيريا العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية. بلغ مردود استخلاص المركبات الفينولية نسبة 25.95% في المستخلص المائي ، 11.25% في المستخلص الميثانولي و 6.55% في المستخلص الإيثانولي . تم اختبار هذه المستخلصات لمعرفة تأثيرها المحتمل المضاد للبكتيريا في المختبر ، ضد أربع (04) سلالات من بكتيريا باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص في الوسط الصلب.

تفاعلت المستخلصات بشكل إيجابي وبطريقة مميزة مع جميع السلالات المختبرة بقوة مثبتة قوية للغاية للمستخلص الإيثانولي. التأثير المضاد للبكتيريا الذي تم الحصول عليه هو تأثير يعتمد على الجرعة يتميز بتكوين مناطق تثبيط متناسب مع التركيزات المستخدمة.

تشير حساسية سلالات المجتمع متعددة المقاومة من البكتيريا العنقودية الذهبية لمستخلصات الزعر إلى إمكانية استخدام هذا الأخير كعلاج بديل للمضادات الحيوية لعلاج التهابات الجهاز البولي التناسلي.

الكلمات المفتاحية: الزعر، مستخلصات الفينول، نشاط مضاد للبكتيريا، البكتيريا العنقودية الذهبية.