



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abbès Laghrou Khenchela

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

**Présentée en vue d'obtenir le diplôme de Master en Microbiologie
appliquée (LMD)**

Thème :

**L'investigation- *in vitro*- de l'effet de la
polythérapie sur des bactéries pathogènes
présentant le phénotype multi -drogue
résistance (MDR)**

Présenté par

Bourmada Madjeda et Chaabana Khaoula

Jury de soutenance

Président: Mme Naili.O.

Rapporteur: Mme Kara Ali W.

Examinatrice: Mme Boutarfa S.

MCB. Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

MCB Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

MAA. Univ. Abbès Laghrou -Khenchela

Année universitaire 2020-2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

A Allah Tout puissant Qui nous a inspiré, Qui nous a guidé dans le bon chemin, qui nous a donné la force et la vie pour accomplir cette tâche. Louanges et remerciements Pour votre clémence et miséricorde..

*Nous remercions et témoignons notre reconnaissance, bien sûr, en priorité, notre encadreur **Dr. "Karaali Wahiba "** qui en tant que directrice de mémoire qui est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire. Ainsi, pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Puissiez-vous trouver dans ce travail l'expression de notre sincère gratitude et notre plus grand respect*

*Nous tenons à remercier infiniment en acceptant tout notre respect et amour : **Mme Naili. O** et **Boutarfa. S** pour l'honneur qu'elles nous ont fait pour évaluer ce travail.*

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de l'université Abbes l'aghrour khenchela , Nous tenons donc de remercier l'équipe du laboratoire qu'il le dirige qui nous a soutenue dans la réalisation de ce travail. Merci pour votre sympathie, votre gentillesse et votre disponibilité et pour le temps que vous avez consacré pour nous.

Une grande reconnaissance et un grand remerciement à tous nos enseignants qui ont participé à ma formation. Dans les deux années M1 et M2

Enfin nos remerciements sont dressés plus particulièrement à nos familles et à toute personne pour toute contribution de près ou de loin à la réalisation de cette mémoire.

Madjeda et Khaoula





Dédicace

Je dédie notre travail

*A la mémoire de mon père Belgassem, puisse Dieux
l'accueillir dans son vaste paradis.*

A mes chère mères Yamina et Maya, que dieux les protège

*A mon cher époux **Abderrazzak** qui m'a soutenu tout au long de mon travail par
sa patience, sa compréhension et son encouragement.*

A mes petits les plus chers: Koussay, Ouday, Chahine et Ayhem.

A mes sœurs et mes frères et leurs fils

A toute ma famille et la famille de mon époux surtout Meriem

*J'étais toujours bien entouré, bien soutenu, par et avec vous mes chères amies. Je
vous remercie pleinement surtout mon amie Samira.*

*A mon binôme Madjeda Bourmada, la plus adorable et
la plus proche pour moi, qu'elle prend une grande place
dans ma vie et qu'elle m'a partagée tous les moments
de joie et de succès. Jamais je ne voudrais briser notre amitié*

*A tous ce qui j'aime et m'aime et m'a soutenu de près ou
de loin pour réaliser mon travail*

Khaoula 





Dédicace

Je dédie notre travail

A mon père Que le bon dieu l'accepte dans son vaste paradis

*A ma mère Que dieu la présente une bonne santé et une
longue vie*

A mon mari Adel et mes enfants Sami, Syrine et Mariya

A mes sœurs: Linda, Dalel, Amel et leurs fils

Qui m'ont Soutenu tout au long de ma vie

*Par leur patience, leur amour et
leur encouragement*

A toute ma famille

*A mon binôme Khaoula Chaabana , je la remercie pour le
courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a
passé ensemble*

*A tous ceux que j'aime et qu'ils m'aiment Qu'ils trouvent
dans ce travail l'expression de sentiments les plus
affectueux,*

Madjeda



Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction 2

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2

I. Les antibiotiques 5

I.1. Historique 5

I.2. Définition 6

I.3. Classification 6

I.3.1. Bêta-lactamines 6

I.3.2. Aminosides 6

I.3.3. Macrolides et apparentés 6

I.3.4. Quinolones et fluoroquinolones 7

I.3.5. Cyclines 7

I.4. Mode d'action 7

I.4.1. Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne 8

I.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique 8

I.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique 8

I.4.4. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques 8

I.4.5. Antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire 8

I.5. Spectre d'action 9

I.5.1. Spectre large 9

I.5.2. Spectre étroit 9

I.5.3. Spectre moyen ou limité	9
I.6. Effets indésirables	11
I.6.1. Effets indésirables communs à tous les antibiotiques.....	11
I.6.1.1.Réactions allergiques	11
I.6.1.2.Troubles digestifs.....	12
I.6.1.3.Hyperthermie	12
I.6.2. Effets indésirables spécifiques à chaque classe	12
II. La résistance bactérienne aux antibiotiques	13
II.1. Définition de la résistance aux antibiotiques.....	13
II.2. Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques	15
II.3.Types de résistance	17
II.3.1. Résistance naturelle (intrinsèque).....	17
II.3.2. Résistance acquise	17
II.4. Causes de l'antibio-résistance	17
II.4.1. Causes de l'antibio-résistance naturelle	17
II.4.2. Causes de l'antibio-résistance acquise	17
II.5. Support de la résistance	18
II.5.1. Support chromosomique.....	18
II.5.2. Support extra-chromosomique	19
II.6. Mécanismes de résistances aux antibiotiques.....	20
II.6.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique	20
II.6.2. Altération de la cible bactérienne	21
II.6.2.1. Altération de la cible ribosomiale.....	21
II.6.2. 2. Altérations des précurseurs de la paroi.....	21
II.6.2.3. Altérations d'enzymes-cible.....	21
II.6.3. Altération de la concentration de l'antibiotique dans la bactérie	22
II.6.3.1. Altération des membranes bactériennes	22

II.6.3.2. Efflux actif de l'antibiotique	22
II.6.4. Multiplication ou protection de la cible.....	22
II.6.5. Court-circuit de l'action antibiotique	23
III.1. La polythérapie antimicrobienne.....	24
III.1.1. Inhibiteurs des bêta-lactamases	24
III.1.2. Sels de bismuth.....	25
III.1.3. Huiles essentielles et métabolites secondaires des plantes.....	25
III.1.4. Inhibiteurs de quorum sensing (QS).....	26
III.1.5. Nanoparticules.....	26
III.1.6. Autres perspectives de la polythérapie contre l'antibio-resistance	26
III.1.6.1. Utilisation des ARN interférents.	26
III.1.6.2. Inhibition de transfert des plasmides.....	26
III.1.6.3. Contrôle de l'activité riborégulateur	27
III.2. Utilisation rationnelle des antibiotiques	27
III.3. Utilisation d'autres agents antimicrobiens contre les bactéries multi-resistantes.....	27
III.3.1. La phagothérapie	27
III.3.2. La vaccination	28
III.3.3. Utilisation de bactériocines	28
III.3.4. Peptides antimicrobiens (AMPs).....	28
III.3.5. L'apithérapie	28
III.4. Autres stratégies	29
IV. Les plantes étudiées	29
VI.1. <i>Centaurea jacea</i>	29
IV.1.1. Description botanique	29
VI.1.2. Classification.....	31
VI.1.3. Utilisation en médecine traditionnelle et activité biologique de la plante	31
VI.2. <i>Syzygium aromaticum</i>	31

VI.2.1. Description botanique	31
VI.2.2. Classification botanique	32
VI.2.3. Utilisation en médecine traditionnelle	33
VI.3. <i>Thymus. sp.</i>	33
V. 3.1. Description botanique.....	33
VI.3. 2. Classification.....	34
VI. 3.3. Usage et propriétés thérapeutiques Traditionnellement.....	34
V. Les métabolites secondaires des plantes	35
V.1. Les alcaloïdes	35
V.2. Les terpénoïdes.....	36
V.3. Les saponines	36
V.4.3. Les tannins.....	37
Chapitre II :MATERIEL ET METHODES.....	39
I. Matériel	40
I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)	40
I.1.1. Plantes médicinales et huiles essentielles	40
I.1.2. Les souches bactériennes	41
I.1.2. Les antibiotiques	41
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations	42
II. Méthodes	43
II.1. Préparation des extraits végétaux	43
II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	43
II.1.2. Préparation de l'extrait des flavonoïdes totaux	44
II.2. Screening phytochimique	45
II.2.1. Screening phytochimique dans l'extrait méthanolique	45
II.2.2. Screening phytochimique dans l'extraitbutanolique	47
II.2.2.1. Mise en évidence des anthocyanes	48
II.2.2.2. Mise en évidence des flavonols	48

II.2.2.3. Mise en évidence des flavones	48
II.2.2.4. Mise en évidence des flavonones	48
II.3. Etude quantitative des extraits	48
II.3.1. Dosage des flavonoïdes	48
II.3.2. Dosage des polyphénols	48
II.4. Etude quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM)	49
II.4.1. Protocole de CCM sur gel de silice	49
II.4.2. Calcul du Rapport frontal	50
II.5. Etude de l'effet des extraits sur l'antibio-résistance	50
II.5.1. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques	50
II.6.2. Valorisation de l'effet inhibiteur des extraits de <i>C.jacea</i> et de l'huile essentielle de <i>S. aromaticum</i> contre l'antibio-résistance par la méthode des disques	52
II.6.2.1. L'ensemencement	52
II.6.2.2. Préparation des disques d'aromatogramme	52
II.6.2.3. Incubation et lecture	53
II.7. Analyse statistique	53
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	54
I. Screening phytochimique	55
I.1. Screening phytochimique dans l'EMCJ	55
I.2. Screening dans l'EBCJ	57
II. Etude quantitative des extraits de <i>C.Jacea</i>	58
II.1. Dosage des flavonoïdes	58
II.2. Dosage des polyphénols totaux	60
II.3. Etude quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM)	61
II.3.1. Séparation des flavonoïdes par CCM	62
II.3.2. Séparation des tanins par CCM	64
II.3.3. Séparation des saponosides par CCM	66
III. Résultats de l'effet des extraits sur l'antibio-résistance :	68

III.1. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques	68
III.2. Valorisation de l'effet inhibiteur des extraits de <i>C. jacea</i> et de l'huile essentielles de <i>S. aromaticum</i> et de <i>Thymus.sp</i> contre l'antibio-résistance par la méthode des disques :	73
III.2.1. Etude de l'effet inhibiteur de l'antibiorésistance par l'EMCJ :	73
III.2.2. Etude de l'effet inhibiteur de l'antibio-résistance par l' EBCJ :	78
IV. L'effet des huiles essentielles sur l'inhibition de l'antibio-résistance	80
Conclusion et perspectives	86
Résumé	87
Abstract	88
ملخص.....	89
Annexe	90
Références bibliographiques	95

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

BLSE : bêta-lactamases à spectre étendu

BMR : Bactérie multi-résistante

CCM : Chromatographie sur couche mince

C.jacea : *Centaurea jacea*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EBCJ : Extrait butanolique de *Centaurea jacea*

E.coli : *Escherichia coli*

EMCJ : Extrait méthanolique de *Centaurea jacea*

HE : Huile essentielle

K.pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

MDR : multi drogue résistante

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : pénicilline

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PLP : protéines de liaison à la pénicilline

R_f : Rapport frontal

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

S.aromaticum : *Syzygium aromaticum*

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques jusqu' à 1990.....	5
Figure 2 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques.....	9
Figure 3 : Chronologie de l'évolution de la résistance bactérienne aux différents antibiotiques.....	16
Figure 4 : Les différents mécanismes d'acquisition de résistance chez les bactéries.....	19
Figure 5 : Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	23
Figure 1 : Quelques photos de <i>Centaurea jacea</i>	30
Figure 7 : Quelques photos de <i>Syzygium aromaticum</i>	32
Figure 2 : photo de <i>Thymus. sp</i>	34
Figure 3 : Les étapes de préparation de l'EMCJ de la plante <i>C. Jacea</i>	44
Figure 4 : Etapes d'extraction des flavonoïdes totaux.....	45
Figure 11 : Résultats obtenus <i>in vitro</i> des tests phytochimiques de l : EMCJ.....	56
Figure12 : Tests de mise en évidence des flavonoïdes.....	57
Figure 13 : Courbes d'étalonnage de la quercétine.....	59
Figure 14 : Teneur en flavonoïdes totaux dans EMCJ et EBCJ (mgEQ/gE).....	59
Figure 15 : Courbes d'étalonnage de l'acide gallique.....	60
Figure 16 : Teneur en polyphénols totaux dans EMCJ et EBCJ (mgEQ/gE).....	61
Figure17 : Séparation des flavonoïdes par CCM après révélation par UV 365 (EMCJ).....	64
Figure18 : Séparation des flavonoïdes par CCM après révélation par UV 365 (EBCJ).....	64
Figure19 : Séparation des tanins par CCM de l'EMCJ.....	65
Figure20 : Séparation des tanins par CCM de l'EBCJ.....	66
Figure21 : après la révélation mettre les plaques dans l'étuve 110° pendant 10mn.....	67
Figure 22 : Séparation des saponosides par CCM de l'EMCJ... ..	67
Figure 23 : Séparation des saponosides par CCM de l'EBCJ.....	67
Figure 24 : L'antibiogramme de <i>Klebsiella.pneumoniae</i>	70
Figure 25 : L'antibiogramme de <i>Pseudomonas.aeruginosa</i>	70
Figure 26 : L'antibiogramme de <i>Escherichia.coli</i>	70
Figure 27 : L'antibiogramme de <i>Staphylococcus.aureus</i>	71
Figure 28 : L'antibiogramme de l' <i>Enterobacter.spp</i>	71

Figure 29 : Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>E.coli</i> à la pénicilline G par l'EMCJ.....	74
Figure 30 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance <i>S.aures</i> à la pénicillineG par l'EMCJ.....	74
Figure31 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>P.aeruginosa</i> à la pénicilline G par l'EMCJ.....	75
Figure32 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>Enrerobacter.spp</i> à la pénicilline G par l'EMCJ.....	75
Figure33 : Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>K.pneumoniae</i> à la pénicilline G par l'EMCJ.....	75
Figure34 :Mécanismes d'inhibition de la résistance aux ATB par les métabolites secondaires issus des plantes médicinales.....	77
Figure 35 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>E.coli</i> à la pénicilline par EBCJ.....	79
Figure 36 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>K.pneumoniae</i> à la pénicilline par EBCJ	79
Figure 37 :photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>S.aureus</i> à la pénicilline par l' EBCJ.....	79
Figure 38 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance D' <i>Enterobacter.spp</i> à la pénicilline par l'EBCJ.....	80
Figure 39 :Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>P.aeruginosa</i> à la pénicilline par l'EBCJ.....	80
Figure 40 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>S.aureus</i> à la pénicilline par HE2 (à gauche après 24 heures d'incubation et à droite après 48 heures d'incubation).....	81
Figure 41 : Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>S.aureus</i> à la pénicilline par HE1.....	81
Figure 42 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>E.coli</i> à la pénicilline par HE2.....	82
Figure 43 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>E.coli</i> à la pénicilline par HE1.....	82
Figure 44 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>Enterobacter.spp</i> à la pénicilline par HE2.....	82
Figure 45 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>Enterobacter.spp</i> à la pénicilline par HE1.....	82
Figure 46 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>K.pneumoniae</i> à la pénicilline	

par HE2.....	82
Figure 47 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>K.pneumoniae</i> à la pénicilline par HE1.....	82
Figure 48 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>P.aeruginosa</i> à la pénicilline par HE2.....	83
Figure 49 :Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de <i>P.aeruginosa</i> à la pénicilline par HE1.....	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : récapitulatif des types d'activité et du mécanisme d'action de quelques familles d'antibiotiques.....	10
Tableau 2 :Différentes caractéristiques des souches bactériennes étudiées.....	12
Tableau 3 :Classification des principales bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques selon l'OMS.....	14
Tableau 4 :Différentes caractéristiques des souches bactériennes étudiées.....	37
Tableau 5 :Liste des bactéries testées et leur source.....	41
Tableau 6 :Antibiotiques utilisés pour les essais d'inhibition de la résistance bactérienne.....	42
Tableau 7 :Tests de screening phytochimique dans l'EMCJ.....	47
Tableau 8 :Les phases mobiles et les révélateurs utilisées pour la séparation des Flavonoïdes, saponosides et tanins dans l'extrait méthanolique de C.Jacea.....	50
Tableau 9 :Screening phyto-chimique préliminaire de l' EMCJ.....	55
Tableau 10 :Les tests de mise en évidence des flavonoïdes :.....	57
Tableau 11 :Résultat de la séparation des flavonoïdes par CCM (EMCJ).....	63
Tableau 12 :Résultat de la séparation des flavonoïdes par CCM (EBCJ).....	63
Tableau13 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'antibiorésistance par l'EMCJ. Erreur ! Signet non défini.	65
Tableau 14 :Résultat de la séparation des saponosides par CCM (EMCJ +EBCJ).....	66
Tableau 15 : Antibiotiques testés pour les souches étudiés.....	68
Tableau 16 :Résultats de l'antibiogramme.....	69
Tableau 17: Résultats de l'effet inhibiteur de l'antibio-résistance par l'EMCJ.....	73
Tableau18 : L'effet inhibiteur de l'antibio-résistance par l'EBCJ.....	78
Tableau 19 :Résultats de l'effet inhibiteur des HE1 et HE2 sur l'antibiorésistance.....	81

Introduction

Introduction

Les antibiotiques sont considérés comme une des révolutions médicales du XX^{ème} siècle, ils ont apportés un immense bénéfice à l'humanité, en permettant de soigner de nombreuses infections bactériennes, et en faisant diminuer considérablement la mortalité qui y était associée.

Malheureusement, au terme de six décennies d'utilisation des antibiotiques, les bactéries pathogènes humaines et animales ayant accumulé dans leurs génomes les différentes résistances et devenues insensibles à une plus large gamme d'antibiotiques, comme cela s'est vu au Japon où des souches de *Pseudomonas aeruginosa* étaient résistantes à toutes les β -lactamines connues.

Les espèces bactériennes développent cette antibio-résistance vis-à-vis chaque antibiotique par plusieurs mécanismes. Ils s'agit de la production des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques, la modification dans la structure des cibles d'action des antibiotiques, la substitution de la cible, la modification de la perméabilité vis-à-vis des antibiotiques et l'activation du processus de l'efflux actif.

L'émergence de la multi-résistance de bactéries pathogènes humaines représente maintenant une menace mondiale croissante de la santé publique et place alors les soignants dans une situation d'impasse thérapeutique et pour cela cette résistance a déclenché un immense intérêt dans la recherche des nouvelles stratégies afin de lutter contre ce phénomène. (Ziai, 2014 ; Muylaert et Mainil, 2013.)

Même si la lutte contre l'antibio-résistance passe principalement par une réduction drastique de leur utilisation, les **antibiotiques** doivent garder leur place dans notre thérapie c'est pour cela actuellement, des efforts sont déployés pour explorer l'effet de la polythérapie ou la thérapie combinée antimicrobienne par l'utilisation simultanée de l'antibiotique avec des agents **non-antibiotiques** qui optimisent l'activité antibactérienne des antibiotiques ou ciblent les mécanismes de résistances.

Des recherches considérables ont été réalisées, pour identifier des modulateurs modifiant la chimiorésistance des souches bactérienne. Cependant les premiers agents inhibiteurs de l'antibio-résistance qui ont été découverts comme les inhibiteurs de β -lactamase, peuvent provoquer des effets indésirables, c'est pour cela les scientifiques ne cessent de rechercher et penchent vers les plantes médicinales riches en multiples substances phytothérapeutiques tel

que les flavonoïdes, les polyphénols, les tanins et les huiles essentielles qui peuvent être l'arme permettant de faire face à l'antibio-résistance sans effets secondaires des substances classiques.

Dans ce contexte on a étudiés dans la présente recherche l'effet des extraits de la plante médicinale: *Centaurea Jcea* et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Thymus sp* sur la réversion de la l'antibio-résistance des souches bactériennes pathogènes pour l'homme.

A notre connaissance la plante *Centaurea Jacea* et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Thymus sp* n'ont été jamais étudiées pour évaluer ces vertus raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants:

- Une étude phytochimique basée principalement sur: la préparation des extraits de la plante *Centaurea Jacea*, les testes phytochimiques, une étude qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) afin d'identifier les types de quelques métabolites secondaires et une étude quantitative pour estimer la quantité des flavonoïdes et polyphénols;
- L'évaluation *in vitro* de l'effet de l'association des extraits de *C.Jaceae* ou les huilles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Thymus sp* avec les antibiotiques dans la réversion de la résistance bactérienne.

Pour ce faire, Le manuscrit a été scindé en trois grandes parties. La première est consacrée a une synthèse bibliographique basée principalement sur la description des antibiotiques (définition , mécanismes d'action, classification...), la résistance bactérienne aux antibiotiques , les différentes stratégies de lutte contre l'antibio-résistance, la description des plantes médicinales sélectionnées (*C.jacea*, *S aromaticum* et *Thymus SP*) et en fin des informations sur les métabolites secondaires et les huiles essentielles des plantes.

La seconde partie comprend les matériels et méthodes qui ont été mis en œuvre, et la dernière partie présente les résultats qui ont fait l'objet d'une discussion approfondie qui a le mérite de comparer nos résultats à ceux déjà développées par des travaux antérieurs. En fin le mémoire se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les antibiotiques

I.1.Historique

Le XXe siècle est sans nul doute le siècle des découvertes scientifiques et du progrès technologique des antibiotiques (ATB). Parmi toutes ces innovations, la découverte et le développement de ces substances ont constitué un progrès majeur qui a révolutionné l'histoire de la médecine. (Lucie Mangin, Nancy ,2011)

En 1887, le Français Ernest Duchesne fut le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des moisissures mais sa découverte n'eut pas de suite.

En effet, en 1928, Sir Alexander Fleming, biologiste écossais observe une inhibition de la croissance des bactéries *staphylocoques* cultivées sur des boîtes de pétri contaminées par un champignon, le *Penicillium notatum*. Il émet alors l'hypothèse que ce champignon est capable de synthétiser une substance aux propriétés antibactériennes, qu'il nomme « pénicilline ».

Mais ce n'est qu'à la fin de la seconde guerre mondiale et en 1945 que son utilisation thérapeutique débute, suite à l'isolement et la purification de la molécule par les chimistes Chain et Florey, ce qui permet son usage clinique. Dès lors, la pénicilline a été massivement utilisée, et a permis de sauver des millions de vie.

Par la suite, de nombreuses autres molécules antibiotiques ont été découvertes (Figure 1), (Allison Muller , 2017)

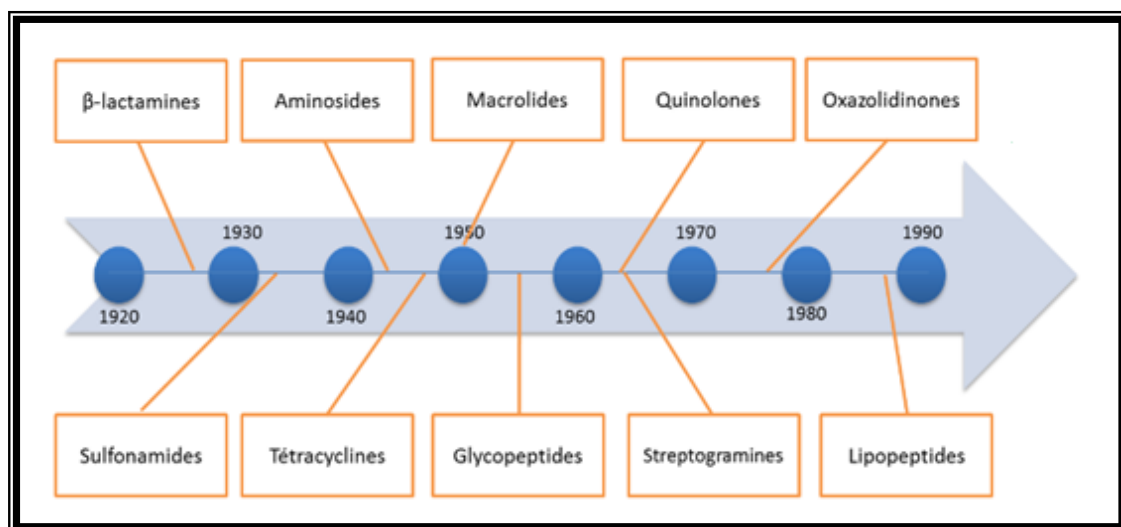


Figure 1. Chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques jusqu' à 1990 (Allison Muller,2017)

I.2. Définition

Les antibiotiques (du grec *anti* : *contre*, et *bios* : *la vie*) sont des substances chimiques produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémisynthèse, qui ont une action spécifique avec un pouvoir destructeur sur les microorganismes – substance antimicrobienne- et qui agissent à faible concentration sur les microorganismes en bloquant des étapes métaboliques indispensables à leur survie ou à leur croissance. Elles sont dépourvues de toxicité pour les autres cellules. (Lucie Mangin,2016)

I.3. Classification

Les antibiotiques sont classés selon leur structure chimique, leur type de spectre d'action, ou leur origine. Il existe cinq principales classes des antibiotiques sous-classes: (Anaïs Veyssiere,2019)

I.3.1. Bêta-lactamines

Comprenant les pénicillines des groupes G/V,M, A, les carboxypénicillines, les uréidopénicillines, les amidinopénicillines et les carbapénèmes, un monobactam et les céphalosporines. Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides . (D.Yala , A.S. Merad et al.,2001)

I.3.2. Aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques précieux en raison de leur spectre d'action et de leur efficacité. Néanmoins, leur coefficient thérapeutique n'est pas excellent et oblige à un strict respect des indications ainsi qu'à une surveillance attentive, ce qui explique que les prescripteurs leur préfèrent des antibiotiques plus maniabes. De plus, leur utilisation est freinée par leur absence d'activité par voie orale. (Jacques Buxeraud,2016)

I.3.3. Macrolides et apparentés

Les premiers macrolides sont d'origine naturelle (érythromycine, spiramycine, trioléandomycine). Des nouveaux dérivés semi-synthétiques de l'érythromycine (roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) présentent d'importantes différences dans leurs paramètres pharmacocinétiques et une diminution nette des interactions médicamenteuses. Les kétolides présentent une activité vis-à-vis de souches résistantes aux macrolides conventionnels. (Françoise Van Bambeke et Al, 2007)

I.3.4. Quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones et les fluoroquinolones sont des antibiotiques administrés par voie systémique ou par voie inhalée, utilisés pour traiter des infections bactériennes au cours desquelles le pronostic vital peut être engagé.

Bien qu'ils soient rares, des effets indésirables graves, durables, invalidants et potentiellement irréversibles, affectant principalement le système musculo-squelettique et le système nerveux ont été rapportés avec les antibiotiques de la famille des (fluoro) quinolones. (Abdelkader Helali ,2019)

I.3.5. Cyclines

Les cyclines ou tétracyclines sont appelées ainsi à cause de leurs quatre cycles accolés. Dans cette famille on retrouve la doxycycline, lymécycline, minocycline et tigécycline (disponible seulement à l'hôpital). (Anaïs Veyssiere,2019)

En dehors de ces cinq classes on retrouve aussi les glycopeptides lipo-glycopeptides (vancomycine, teicoplanine, dalbavancine), la fosfomycine, un lipopeptide (daptomycine), les polymyxines, les phénicols, l'acide fusidique, les oxazolidinones, les quinoléines, la mupirocine, les sulfamides et triméthoprime, les produits nitrés et les antituberculeux. (Anaïs Veyssiere,2020)

I.4. Mode d'action

Un antibiotique est une molécule qui va empêcher la multiplication des bactéries ou entrainer leur destruction en agissant sur une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. On distingue deux types d'antibiotiques sur base du type d'activité qu'ils exercent:

- Les antibiotiques bactéricides : qui tuent les bactéries;
- Les antibiotiques bactériostatiques : qui ralentissent la croissance bactérienne pouvant aller jusqu' à l'arrêt de la croissance bactérienne.

Les antibiotiques agissent sur les bactéries par liaison à des cibles spécifiques le plus souvent intra cellulaires en inhibant des fonctions physiologiques précises, telles que : la synthèse de la paroi, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse protéique ou encore la respiration cellulaire. (figure 2) (Le-guide-pratique-des-bacteries-pathogenes,2017)

I.4.1. Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

La plupart des antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont en réalité des inhibiteurs du peptidoglycane et ils sont des antibiotiques bactéricides. comme c'est le cas des des bêtalactamines, des glycopeptides et de la fosfomycine.

I.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

La polymixine B et la colistine sont deux antibiotiques qui agissent sur la membrane cytoplasmique, en perturbant sa synthèse, ils sont actifs sur les bacilles à Gram négatif.

I.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

Les antibiotiques peuvent empêcher la traduction de l'ARNm et donc la formation de nouvelles protéines par fixation sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien (sous unités 30S et 50S). C'est l'exemple de l'action des tétracyclines, des aminosides, des chloramphénicols, des macrolides, de l'acide fucidique et linézolide.

I.4.4. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques

Les rifampicines, sulfamides, quinolones et triméthoprim inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les différentes familles des antibiotiques par:

- Inhibition de la réplication de l'ADN;
- Inhibition de la transcription ARN polymérase;
- Diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques.

(Karaali Wahiba , Polycopie cours en pharmacologie , toxicologie , 2020-2021)

I.4.5. Antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire

Le cotrimoxazole est un antibiotique bactéricide, il inactive les enzymes impliqués dans la synthèse des porines (Les porines sont des protéines membranaires formant des canaux permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles à travers la membrane des cellules) et de certains acides aminés essentiels. (Le-guide-pratique-des-bacteries-pathogenes,2017).

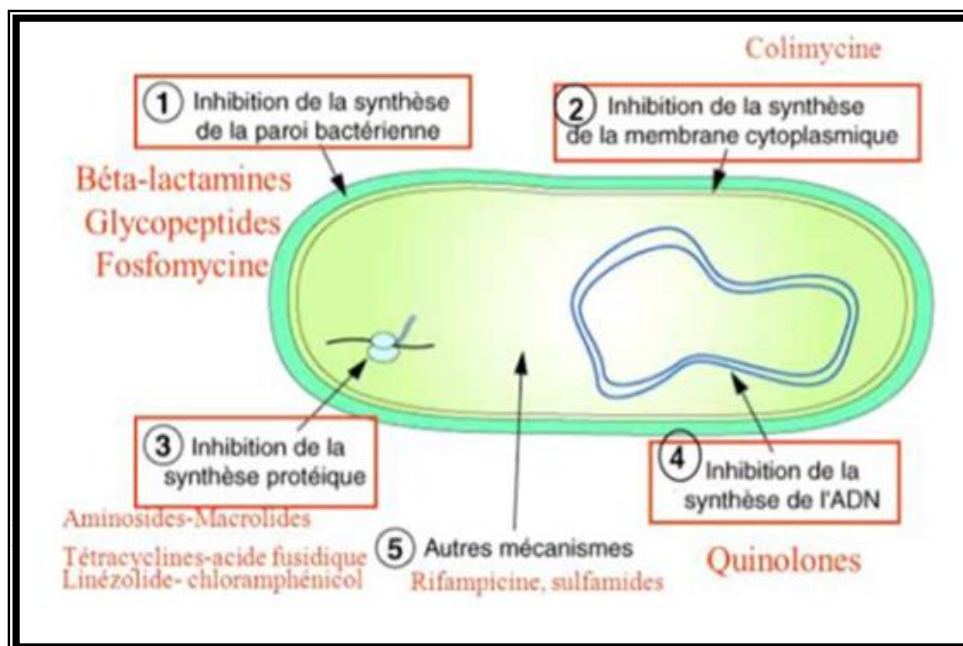


Figure 2. Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Anaïs Veyssiere,2020)

I.5. Spectre d'action

Le spectre d'action caractérise un antibiotique, est l'ensemble des germes (types de bactéries) sensibles à un antibiotique déterminé.

I.5.1. Spectre large

Il s'agit d'un antibiotique efficace sur un grand nombre de types de germes (grande partie de tous les *cocci* et de tous les *bacilles*. Les antibiotiques à spectre large (pénicilline A) seront utilisés lorsque le germe n'est pas identifié et que la pathologie peut être due à différents types de germes, par exemple une angine peut avoir comme cause plusieurs germes différents.

I.5.2. Spectre étroit

Il s'agit d'un antibiotique efficace sur un nombre limité de types de germes. Cette spécificité lui permet ainsi de cibler un germe et une pathologie.

I.5.3. Spectre moyen ou limité

Il s'agit d'un antibiotique dont l'efficacité est réduite ou partielle sur un groupe de germes. Il concerne aussi un spectre anciennement large et réduit par l'apparition de résistance bactérienne. (Le-guide-pratique-des-bacteries-pathogenes,2017)

Le tableau ci-dessous résume le type d'activité et les mécanismes d'action de quelques familles d'antibiotique.

Tableau 1.Tableau récapitulatif des types d'activité et du mécanisme d'action de quelques familles d'antibiotiques

Famille des antibiotiques	Type d'activité	Mécanisme d'action
β-lactamines : Pénicilline V Amoxicilline Ceftiofur	Bactéricide sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse de paroi bactérienne
Aminosides : Streptomycine Gentamycine Néomycine Spectinomycine	Bactéricide sur les bactéries en prolifération et au repos	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes
Macrolides: Erythromycine Tylosine Spiramycine Kitasamycine Josamycine Tilmicosine	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes
Lincosamides : Lincomycine	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes
Pleuromutilines : Tiamulin	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes
Phénicoles : Chloramphénicole Florenchénicole	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes
Tétracycline Oxytétracycline	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Inhibition de la synthèse des protéines

Doxycycline		bactériennes
Inhibiteurs de folate : Sulfonamides Thriméthoprim	Bactériostatique sur les bactéries en prolifération	Modification du métabolisme énergétique
Nitrofuranes : Furazolidone Furaldatone	Bactéricide/bactériostatique sur les bactéries en prolifération et au repos	Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien
Polymyxines Colistine	Bactéricide sur les bactéries en au repos	Inhibition de la synthèse de membrane cytoplasmique
Quinolones : Acide Oxolonique Fluoroquinolones : Fluméquine Enrofloxacin Danofloxacin Difloxacin	Bactéricide sur les bactéries en prolifération et au repos	Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien

I.6. Effets indésirables

Les effets indésirables varient selon les familles des antibiotiques et ils existent des effets communs à tous les antibiotiques et d'autres spécifiques à chaque classe ;

I.6.1. Effets indésirables communs à tous les antibiotiques

I.6.1.1. Réactions allergiques

Elles apparaissent souvent soudainement et correspondent à des réactions exagérées de l'organisme contre l'antibiotique qu'il identifie comme étrangère. Les réactions allergiques peuvent toucher tous les organes, notamment la peau où Elles se manifestent de différentes manières : le prurit (Démangeaisons), l'urticaire, les rougeurs et les éruptions cutanées (éruption de boutons, et plus rarement, éruption bulleuse potentiellement grave) Ensuite vient l'œdème, qui s'exprime par le visage et les membres enflés. Plus rarement, il peut se produire un choc anaphylactique, qui est un malaise généralisé avec coma et accident cardio-vasculaire (potentiellement mortel). La survenue d'une réaction allergique nécessite l'arrêt du traitement. (Vidal ,2015)

I.6.1.2.Troubles digestifs

Les troubles digestifs peuvent apparaître immédiatement ou après quelques jours de traitement. La diarrhée est l’effet secondaire le plus fréquent de l’antibiothérapie (en accélérant le transit intestinal). Il est également constaté souvent des nausées et des vomissements.

Ainsi tous les antibiotiques perturbent la flore intestinale, qu’ils détruisent de manière plus ou moins accentuée. L’équilibre de cette flore étant modifié, la digestion et le fonctionnement de l’intestin sont perturbés. Cela peut provoquer des maux de ventre, des diarrhées ou des ballonnements.

I.6.1.3.Hyperthermie

La température augmente dès le début de l’antibiothérapie, puis redescend rapidement, signe de réussite du traitement bactéricide. Cette hyperthermie est due à la libération massive de toxines hyperthermisantes lors de la lyse (destruction) bactérienne.

I.6.2. Effets indésirables spécifiques à chaque classe

Ils dépendent de l’affinité de l’antibiotique pour un organe donné, où il va se concentrer et créer des troubles. Les effets indésirables spécifiques à chaque classe des antibiotiques sont présentés dans le tableau 2.(Vidal ,2015)

Tableau 2 : Différentes caractéristiques des souches bactériennes étudiées.

Antibiotiques	Effets indésirables
Pénicillines Céphalosporines Carbapénèmes	- Allergie - Diarrhée - Convulsion
Aminosides	- Néphrotoxicité - Ototoxicité
Macrolides	- Atteinte digestive (le plus fréquent) Allergie - Allongement du QTc, risque d’arythmie maligne - Interactions médicamenteuses
Quinolones	- Atteinte digestive (le plus fréquent)

	<p>Allergie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ne pas administrer < 18 ans, atteinte osseuse - Tendinopathie / rupture de tendons - Allongement du QTc, risque d'arythmie maligne - Interactions médicamenteuses
Clindamycine	<ul style="list-style-type: none"> - Allergie - Diarrhée
Tétracyclines	<ul style="list-style-type: none"> - Photosensibilité - Décoloration des dents et atteinte osseuse (ne pas administrer aux femmes enceintes ni aux enfants < 8 ans) - Atteinte digestive et hépatique - Atteinte du système nerveux central (vertiges)
Daptomycine	Toxicité musculaire
Nitrofurantoin	<ul style="list-style-type: none"> - Atteinte digestive - Pneumonite d'hypersensibilité - Atteinte hépatique (cholestase) - Anémie hémolytique
Fosfomycine	<ul style="list-style-type: none"> - Atteinte digestive - Céphalée

II. La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques est l'une des causes d'inefficacité clinique de l'antibiothérapie d'infections guérissables.

II.1. Définition de la résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne est définie comme la capacité d'une bactérie à résister ou croître en présence soit d'un seul antibiotique ou plusieurs familles d'antibiotiques (Sophie Ziai, 2014)

On parle alors de bactéries multirésistantes (BMR). Dans des cas extrêmes, heureusement encore très rares, une bactérie peut être résistante à tous les antibiotiques utilisables chez l'homme. La souche bactérienne résistante supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. La résistance bactérienne est responsable d'un phénomène aux proportions alarmantes. Le tableau 3 ci-dessous représente les principales bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques selon l'OMS (Allison Muller, 2017)

Tableau 3. Classification des principales bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques selon l'OMS

		Exemples de bactéries	Principales infections associées	Résistance aux ATB
Cocci Gram +	AERO-ANAEROBIES FACULTATIFS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Suppurations, septicémies, ostéites, endocardites	résistance à la méthicilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine
	ANAEROBIES AEROTOLERANTS	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Infections respiratoires, méningites	résistance à la pénicilline
	ANAEROBIES FACULTATIFS	<i>Enterococcus faecium</i>	Infections urinaires Bactériémies Endocardites Infections intra-abdominales et pelviennes Infections cutanées, des tissus mous et des plaies	résistance à la vancomycine
Cocci Gram -	AEROBIES	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Infections sexuellement transmissibles (IST)	résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones
Bacille Gram+	ANAEROBIES TELLURIQUES	<i>Clostridium difficile</i>	Colite pseudo-membraneuse	Résistance aux tétracyclines et aux macrolides
		<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos	
		<i>Clostridium perfringens</i>	Gangrène gazeuse	
		<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme	
	AEROBIES	<i>Haemophilus influenzae</i>	Infections respiratoires, méningites	résistance à l'ampicilline
		<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Suppurations, septicémie	résistance aux carbapénèmes

Bacille Gram	AERO- ANAEROBIES FACULTATIFS	Enterobactéries	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infections nosocomiales	résistance aux carbapénèmes
			<i>Shigella spp</i>	Dysenterie bacillaire	résistance aux fluoroquinolones
			<i>Salmonella sp.</i>	Typhoïdes, toxi-infection alimentaire	
			<i>Escherichia Coli</i>	Infections urinaires, digestives	résistance aux carbapénèmes, production de BLSE
			<i>Proteus mirabilis</i>	Infections urinaires	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infections pulmonaire, urinaires			
	MICRO- AEROPHILES	<i>Helicobacter pylori</i>		Ulcère gastro-duodéal Gastrite chronique	résistance à la clarithromycine
<i>Campylobacter spp</i>		Gastro-entérite et infection des gencives	résistance aux fluoroquinolones		

II.2. Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Le phénomène d’antibio-résistance n’est pas nouveau, mais le nombre de microorganismes résistants, et multi-résistants, ainsi que les localisations géographiques affectées ne cessent de croître dans des proportions inquiétantes. Dans les années 1930, des spécimens de *Streptococcus pyogenes* résistants aux sulfonamides furent isolés dans plusieurs hôpitaux militaires (lieux où les antibiotiques sont les plus utilisés).

Environ dix ans plus tard, peu avant la commercialisation de la pénicilline, une pénicillinase bactérienne fut découverte (enzyme sécrétée par diverses bactéries et capable d’inactiver certains antibiotiques du groupes des pénicillines). La bactérie la plus impliquée dans ce phénomène était *Staphylococcus aureus*. Des études ont alors été menées afin de synthétiser des médicaments capables de ne pas être atteints par cette désactivation d’activité enzymatique.

Dans les années 1940, peu après la découverte de la streptomycine et son utilisation pour soigner la tuberculose, des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistants à ce traitement furent isolées.

Deux ans plus tard, la première résistance aux sulfamides est décrite suivie en 1946 de la résistance à la pénicilline G.

C'est ainsi que dans les années 1960 fut commercialisée la pénicilline ; malheureusement, peu de temps après, des scientifiques découvrirent des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à cet antibiotique.

Entre les années 50 et 60 les premiers cas de la multi-résistance , ont été détecté pour des bactéries entériques telles que *Escherichia coli*, *Salmonella sp* et *Shigella sp*.

dans les années 1970, Ils ont pensé que le problème de la multirésistance est limité seulement aux bactéries gastro-intestinales, jusqu'à la découverte d'une souche bactérienne - *Haemophilus Influenzae*- résistante à l'ampicilline ,chloramphénicol et tétracycline.

Depuis les années 1980, le phénomène de multi-résistance est devenu un problème de grande ampleur en ce qui concerne la tuberculose, et le traitement contre cette pathologie nécessite maintenant l'utilisation d'au moins quatre drogues différentes pour être efficace. Plus récemment ils ont constaté l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes naturellement aux trois antibiotiques (carbapénèmes, quinolones et aminosides). (Sophie Ziai ,2014)

La figure 3 montre un schéma récapitulatif de l'évolution de la résistance des bactéries pour combattre les différents antibiotiques

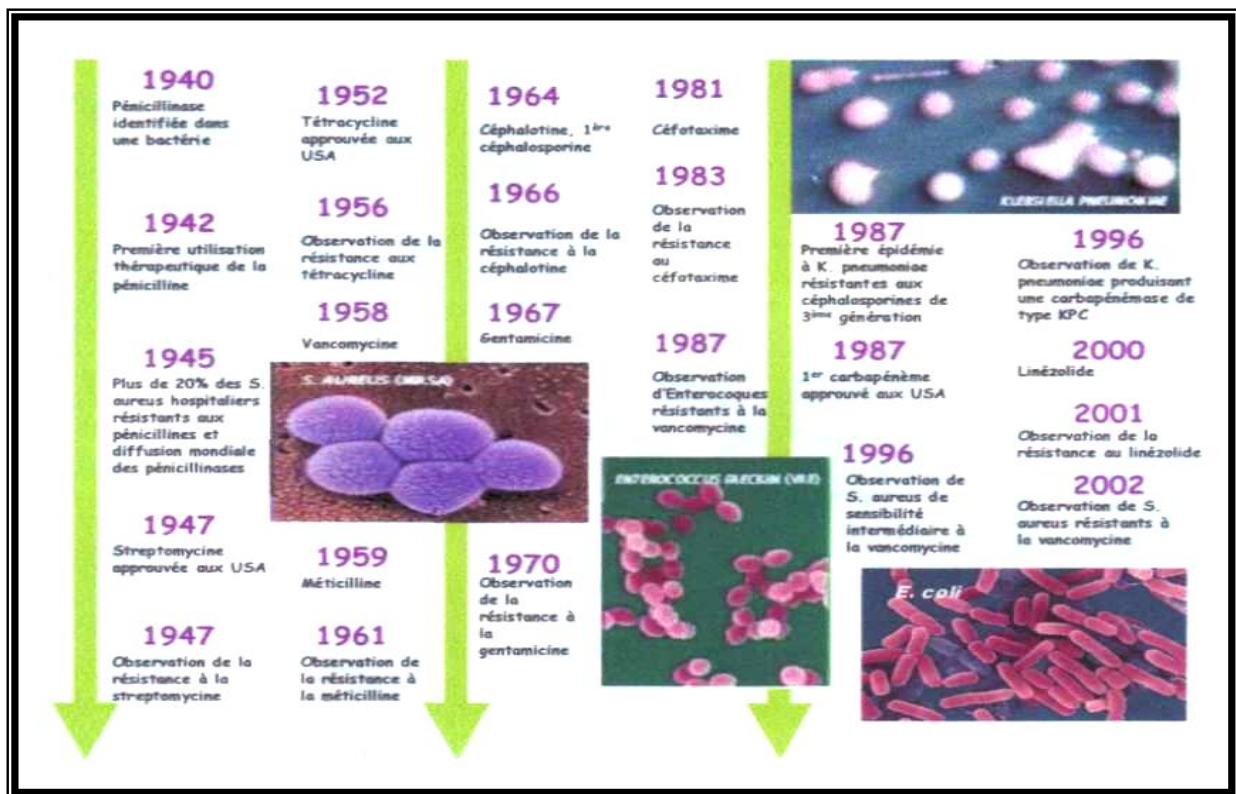


Figure 3. Chronologie de l'évolution de la résistance bactérienne aux différents antibiotiques (Sibylle Bevilacqua , 2011)

II.3.Types de résistance

La problématique de la résistance bactérienne liée au mésusage des antibiotiques concerne le phénomène de résistance acquise, qui est à différencier de la résistance naturelle. (Allison Muller,2017)

II.3.1. Résistance naturelle (intrinsèque)

Dans la résistance naturelle, le germe se trouve à l'état naturel depuis très longtemps résistant à l'antibiotique. Cette résistance fait partie du patrimoine génétique de l'espèce et est donc présente chez toutes les souches d'une même espèce. Héritaire, et reste stable en fonction du temps.

II.3.2. Résistance acquise

On parle de résistance acquise lorsqu' un germe d'une espèce bactérienne était naturellement sensible à un antibiotique y devient résistant au cours du temps. La résistance acquise se caractérise donc par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui étaient auparavant sensibles. (Lucie Mangin , 2016)

II.4. Causes de l'antibio-résistance

II.4.1. Causes de l'antibio-résistance naturelles

La résistance naturelle est due le plus souvent à un défaut d'affinité ou à une inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, par exemple, la résistance naturelle des *Entérobactéries* et *Pseudomonas spp* aux macrolides (molécules trop volumineuses pour traverser via les porines) ; ou encore les bactéries à Gram négatif résistantes à la vancomycine (qui ne peut accéder au peptidoglycane de la paroi bactérienne).

II.4.2. Causes de l'antibio-résistance acquise

Les causes d'extension du phénomène de résistance bactérienne acquise sont multifactorielles :

- A. Prescription inappropriée d'un antibiotique : L'absence d'analyse bactériologique avant la mise en place du traitement peut contribuer à la résistance bactérienne aux antibiotiques, comme en cas de prescription d'un antibiotique pour lutter contre une

infection virales ou pour traiter une infection par une bactérie résistante à cet antibiotique, contre lesquelles ils n'ont aucun effet;

- B.** La prescription trop fréquente d'antibiotiques à large spectre, au lieu d'antibiotiques mieux ciblés dans le cadre d'un diagnostic plus précis;
- C.** L'utilisation inadéquate par le patient, qui ne respecte pas la posologie (utilisation d'une dose trop faible) ou la durée du traitement (durée trop courte), ce qui signifie que certaines bactéries peuvent survivre et devenir résistantes;
- D.** La sur-utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire et de l'agriculture a pour conséquence la présence d'antibiotiques dans les aliments et l'eau qui peuvent causer une résistance bactérienne chez l'homme;
- E.** Persistance environnementale de l'antibiotique : l'élimination des antibiotiques par voie urinaire (déchets domestiques) et la gestion des déchets hospitaliers et de l'industrie pharmaceutique, permet de laisser des traces d'antibiotique dans les eaux usées ;
- F.** Les bactéries non pathogènes (flores commensales) qui résistent aux antibiotiques après une sur-utilisation de ces substances peuvent aussi constituer une source de gènes de résistance qui pourront être transférés à d'autres bactéries pathogènes. (Lucie Mangin , 2016) + (Sophie Ziai ,2014)

II.5. Support de la résistance

La résistance naturelle est un phénomène inné puisqu'elle est ancrée dans le génome bactérien. En revanche, la résistance acquise est due à une modification génétique qui peut être chromosomique ou extra-chromosomique.

II.5.1. Support chromosomique

10 à 20% de la résistance bactérienne acquise est dû à une mutation génétique affectant un gène de structure ou de régulation dans le chromosome bactérien soit d'une manière spontanée (changement spontané du génome bactérien) ou induite par l'adaptation d'une bactérie à des conditions défavorables à sa croissance (notamment présence d'antibiotiques).

II.5.2. Support extra-chromosomique

80 à 90 % de la résistance bactérienne acquise est due à l'acquisition des gènes de résistance mobiles par trois mécanismes (Figure 4) : (Lucie Mangin , 2016)

- A. Conjugaison** : un gène est transféré d'une bactérie à une autre via des plasmides ou des transposons (transfert inter-espèce, souvent à partir de bactéries non pathogènes de l'environnement);
- B. Transduction (transfert viral)**: un gène est transféré d'une bactérie à une autre via un bactériophage (transfert intra-espèce);
- C. Transformation** : transfert d'ADN entre deux bactéries (transfert intra- ou inter-espèce). (Allison Muller,2017)

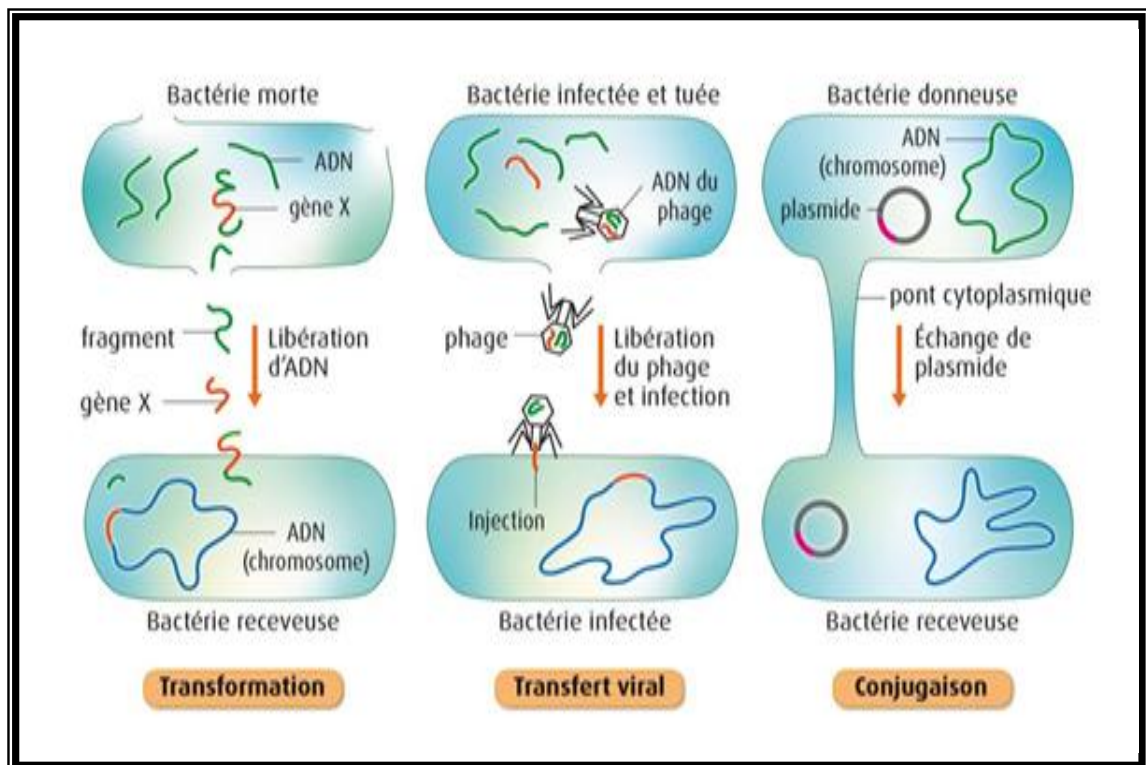


Figure 4. Les différents mécanismes d'acquisition de résistance chez les bactéries.
(Amelie veaux. Manuel SVT Terminale spécialité)

II.6. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

Un antibiotique doit atteindre sa cible, Afin de pouvoir exercer son activité antibactérienne soit par une:

- Action sur la paroi de la bactérie :L'antibiotique bloque l'assemblage des éléments protidiques et lipidiques constituant la paroi de la bactérie;
- Action sur l'ADN : L'antibiotique bloque l'ouverture de l'ADN et empêche son dédoublement;
- Action sur la synthèse protéique : L'antibiotique perturbe la lecture de l'information au niveau du ribosome. Les protéines ainsi fabriquées ne sont pas utilisables : la bactérie ne peut ni vivre ni se développer;

Alors que les bactéries développent plusieurs stratégies afin d'empêcher l'une ou l'autre de ces mécanismes (Figure5), et ainsi permettre l'émergence de résistances aux antibiotiques par différentes mécanismes. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances. (Toure Daouda , 2015) + (Sophie Ziai ,2014)

II.6.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Ce mode de résistance implique l'inactivation de l'antibiotique par un enzyme bactérien. porte le nom de l'antibiotique qu'elle détruit. terminé par le suffixe « ase ». Exemple : pénicillinase. Une même bactérie peut posséder les gènes codant pour plusieurs enzymes de résistances :

- Les β -lactamases : catalysent l'hydrolyse du cycle β -lactame. Elles sont le plus souvent codées par des plasmides. Les plus grands producteurs de β -lactamases sont les staphylocoques, mais surtout les Gram (-); (Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm et Al ,2007)
- Les enzymes modifiant les aminoglycosides comme les N-acétyltransférases, les O-nucléotidases , et les O-phosphorylases. Ces enzymes sont souvent présents chez *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries et les coques à Gram (+).

II.6.2. Altération de la cible bactérienne

En raison d'un très grand nombre de multiplications, une modification due au hasard dans le matériel génétique responsable de la cible bactérienne aux antibiotiques peut apparaître. Comme l'interaction entre l'antibiotique et la molécule cible est assez spécifique, de faibles modifications de la cible peuvent avoir des effets importants sur la liaison de l'antibiotique et par conséquent cette modification permet la résistance à l'antibiotique.

II.6.2.1. Altération de la cible ribosomiale

La résistance bactérienne aux antibiotiques qui agissent sur la synthèse protéique est due principalement à une mutation de leur site de fixation sur le ribosome bactérien.

Une mutation par méthylation au niveau de la sous-unité 50S, confère la multi-résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines chez *S. aureus*, *C. perfringens*. Tandis que une mutation au niveau de la sous-unité 30S, confère la résistance à la streptomycine. (Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm et Al ,2007)

II.6.2. 2. Altérations des précurseurs de la paroi

Les glycopeptides doivent exercer leur action antibiotique par sa liaison aux extrémités D-Ala-D-Ala des chaînes pentapeptidiques (précurseurs de peptidoglycane). Des souches d'entérocoques ont acquis un ensemble de gènes conduisant à la production d'une série d'enzymes permettant la synthèse de peptidoglycane au départ d'un précurseur caractérisé par une extrémité D- ala -D-Lac à laquelle les glycopeptides ne se lient plus.

II.6.2.3. Altérations d'enzymes-cible

Les antibiotiques inhibiteurs d'enzyme sont rendus inactifs lorsqu'une mutation de l'enzyme-cible y empêche leur liaison.

La résistance aux β -lactames peut être due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux Penicillin Binding Proteins (PBP) suite à une mutation de celles-ci, ou à une diminution du nombre de PBP produites. Ces deux mécanismes peuvent se rencontrer chez les Gram (+) alors que seule la réduction d'affinité est documentée chez les Gram (-). L'exemple le plus connu de ce type de résistance est constitué par les MRSA (Methicillin Resistant S.aureus). (Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm et Al ,2007)

II.6.3. Altération de la concentration de l'antibiotique dans la bactérie

II.6.3.1. Altération des membranes bactériennes

La membrane externe des Gram (-) peut constituer une barrière à la pénétration des antibiotiques. En effet, le passage de petites molécules hydrophiles n'est possible que grâce à la présence de porines qui forment des canaux aqueux à travers cette membrane. En revanche, des molécules trop volumineuses ou insuffisamment hydrophiles ne pourront pénétrer que modestement dans les bactéries. Toute mutation affectant une porine va perturber la pénétration de l'antibiotique dont elle permet l'entrée. (Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm et Al ,2007)

II.6.3.2. Efflux actif de l'antibiotique

Le mécanisme de résistance par le système des efflux est un mode de résistance intrinsèque des bactéries, réside dans l'excrétion active de l'ATB par des Pompes à protons qui sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la Résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extra cellulaire. L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec les Tétracyclines à la fin des années 1970. L'exposition aux antibiotiques entraîne la surexpression par mutation de pompes (transporteurs), ce qui entraîne une hausse des résistances bactériennes. (Sibylle Bevilacqua , 2011). Ces pompes peuvent être des transporteurs «drogue spécifiques» et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques, c' est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides (Markham , Neyfakh,2001). Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR) -Multi-Résistance aux Drogues- des bactéries vis-à-vis des antibiotiques . Les gènes, codant pour les pompes «drogue-spécifiques», sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (Butayeetal, 2003 ; Sibylle, 2011 ; Françoise ,2007)

II.6.4. Multiplication ou protection de la cible

Une stratégie plus rare consiste dans une multiplication de la cible, de telle sorte que l'antibiotique est incapable de saturer celle-ci. Un exemple est décrit chez *S. aureus*, où des souches présentent un niveau de résistance intermédiaire aux glycopeptides par production

d'une paroi épaisse où abondent des résidus D-Ala-D-Ala (phénotype VISA [Vancomycin Intermédiaire *S. aureus*]). (Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm et Al ,2007)

II.6.5. Court-circuit de l'action antibiotique

Des souches bactériennes auxotrophes caractérisées par une déficience dans les enzymes-cible des antibiotiques peuvent survivre si elles trouvent dans leur environnement la substance normalement produite par ces enzymes. Par exemple, des bactéries ayant perdu leur thymidilate synthase sont résistantes au triméthoprime et survivent en présence de thymidine. (Françoise , Pharm et Al ,2007)

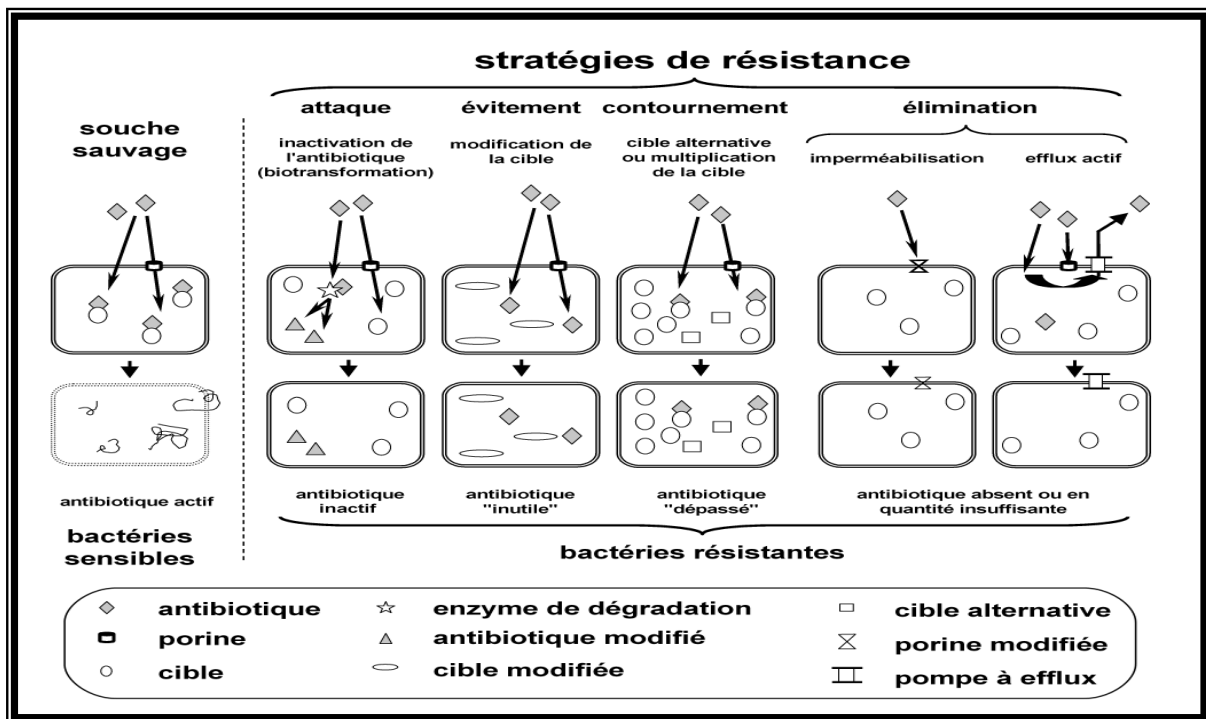


Figure 5. Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. (Mesaros1 , F. Van Bambeke1 , et Al , 2005)

III. Stratégies de lutte contre l'antibio-résistance

Les bactéries développent sans cesse de nouvelles stratégies de défense contre les antibiotiques, au point que certaines infections dues à des microorganismes du tube digestif (entérobactéries), ne disposeraient plus de traitement efficace, causant, en France, 12500 décès par an selon l'Institut de Veille Sanitaire (données 2012)

C'est pour cela il est essentielle de prendre des mesures afin de limiter le phénomène de l'antibiorésistance.

Actuellement, des efforts sont déployés pour explorer de nouvelles voies de lutte (Sophie Ziai ,2014) certaines sont utilisées pour le développement de nouvelles perspectives thérapeutiques, et d'autres sont en cours de recherche et d'essais cliniques. (Anaïs Veysièrè , 2019)

III.1. La polythérapie antimicrobienne

La polythérapie ou la thérapie combinée antimicrobienne est l'utilisation simultanée entre l'antibiotique et agents non-antibiotiques (Association des antibiotiques avec d'autres molécules) qui optimisent l'activité antibactérienne ou ciblent les mécanismes de résistances. L'utilisation initiale d'une polythérapie antimicrobienne pour les infections par les bactéries multi résistantes est souvent justifiée par l'une des raisons suivantes :

- L'élargissement de la couverture antimicrobienne empirique avec deux agents ayant des spectres d'activité différents ;
- La synergie ou l'interaction simultanée observée *in vitro* entre deux ou plusieurs agents antimicrobien agissant sur la même bactérie et montre un effet thérapeutique supérieur par rapport à l'administration d'un seul agent;
- Prévenir ou retarder l'apparition de résistance bactérienne aux antibiotiques;
- L'obtention d'un effet bactéricide maximal afin de prévenir l'émergence de mutants résistants.

Plusieurs interactions entre antibiotique/non antibiotique ont été utilisées :

III.1.1. Inhibiteurs des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont des enzymes qui neutralisent l'activité des antibiotiques. Elles sont synthétisées par les bactéries résistantes aux bêta-lactames. Depuis plusieurs décennies, de nombreux inhibiteurs de bêta-lactamases spécifiques pour chaque classe ont été synthétisés et utilisés en association avec des antibiotiques sensibles au phénomène de la résistance tel que :

- **L'acide clavulanique** : L'acide clavulanique permet d'inhiber les bêta-lactamases bactériennes de la classe A qui sont à l'origine de la résistance observée lors du traitement anti-infectieux avec les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines comme l'amoxicilline;

Sulbactam : est un inhibiteur des bêta-lactamases qui date de la génération de l'acide clavulanique Il est souvent associé avec l'ampicilline dans le but d'améliorer la résistance contre ce dernier; (Toure Daouda , 2015)

- **Avibactam** : connu encore sous le nom chimique NXL104, est un nouvel inhibiteur de bêta-lactamases. Il est utilisé en association avec plusieurs antibiotiques de la classe des bêta-lactamines. Il présente un spectre d'inhibition plus large que ceux de l'acide clavulanique et le sulbactam, comprenant des bêta-lactamases de classe A (pénicillinases, bêta-lactamases à spectre étendu et certains carbapénimases) et des céphalosporinases de la classe C ;
- **Rélébactam** : connu aussi sous le nom chimique de MK-7655, est l'un des nouveaux inhibiteurs des bêta-lactamases dont sa structure est proche de celle de l'avibactam. Le rélébactam, un puissant inhibiteur des bêta-lactamases des classes A (dont les carbapénèmases KPC) et C.

III.1.2. Sels de bismuth

Les sels de bismuth ont un effet antibactérien par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En outre, ils alcalinisent le milieu (accroissent le contenu en ions HCO₃-au niveau de la muqueuse gastrique), ce qui potentialise l'effet des antibiotiques auxquels ils sont associés. Elle est associée à la prise d'oméprazole (un nouveau traitement pour l'éradication de *Helicobacter pylori*). (Khadija Marri , 2019)

III.1.3. Huiles essentielles et métabolites secondaires des plantes

Il s'est avéré que les substances naturelles issues des végétaux peuvent améliorer les performances des antibiotiques car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques.

Certaines huiles essentielles peuvent potentialiser l'efficacité des antibiotiques contre la bactérie MDR. Cependant, l'augmentation progressive de la propagation de la résistance aux antibiotiques a donné une nouvelle vie aux HEs et aux métabolites secondaires des plantes, ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes) provoquant l'augmentation de l'efflux de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule et l'empêcher de sortir comme l'augmentation de la perméabilité des membranes bactériennes par les terpénoïdes, l'inhibition des β -lactamases par l'alkyls gallates et l'empêchement de la modification des récepteurs des antibiotiques. (Toure Daouda , 2015)

III.1.4. Inhibiteurs de quorum sensing (QS)

Le quorum sensing (QS) est un système de communication utilisé par de nombreuses bactéries pour synchroniser leur comportement à la densité de population par des signaux chimiques appelés auto-inducteurs qui sont envoyés dans le milieu dès que la population bactérienne atteint un certain niveau. Ces molécules médiatrices sécrétées coordonnent les comportements collectifs et elles contrôlent l'expression des facteurs de virulence chez de nombreuses espèces pathogènes. Cette approche vise à empêcher l'expression de gènes de virulence sans forcément éliminer les bactéries ce qui permet de limiter l'apparition de mécanismes de résistance comme ceux observés dans le cas de l'utilisation d'antibiotiques. (Khadija Marri , 2019)

III.1.5. Nanoparticules

En microbiologie, les nanoparticules ont trouvé également leurs applications dans l'amélioration des antibiotiques vis-à-vis du phénomène de la résistance. Des études récentes ont montré que des constituants des nanoparticules comme l'argent (Ag), l'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde de cuivre (CuO) et l'oxyde ferrique (Fe₂O₃) ont des propriétés antibiotiques. Cette approche augmente par conséquent l'efficacité des médicaments et limite leurs effets indésirables en modulant le parcours pharmacocinétique ainsi que la biodisponibilité. (Khadija Marri , 2019)

III.1.6. Autres perspectives de la polythérapie contre l'antibio-resistance

III.1.6.1. Utilisation des ARN interférents.

Le principe consiste à trouver dans l'ADN ou l'ARN d'une bactérie certains sites qui contrôlent la synthèse des protéines responsables de la résistance aux antibiotiques, comme par exemple, les gènes qui codent pour les bêta-lactamases. On synthétise alors des segments d'ARN d'une vingtaine de paires de bases appelés ARN interférents capables de se lier exclusivement avec ces sites. Cette liaison spécifique aboutit au blocage la synthèse des protéines impliquées dans la résistance. (Khadija Marri , 2019)

III.1.6.2. Inhibition de transfert des plasmides

Les bactéries possèdent des mécanismes permettant le transfert de gènes à d'autres bactéries sous forme de plasmides. Ainsi, l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques chez une bactérie peut être transmise aux autres en raison de la croissance rapide. De ce fait,

l'inhibition du transfert de matériel génétique entre les souches bactériennes a été discutée comme une stratégie afin de limiter la résistance aux antibiotiques. (Khadija Marri , 2019)

III.1.6.3. Contrôle de l'activité riborégulateur

Les riborégulateurs agissent soit en stoppant la synthèse de molécules essentiels qui sont en excès, soit en activant leur synthèse lorsque celles-ci sont en manque. L'idée de contrôler l'activité des ribosomes impliqués dans la synthèse des protéines de résistance a été proposée en 2007 comme une stratégie de lutte contre cette résistance.

Les chercheurs posent qu'il était possible, d'introduire une molécule spécifique qui trompe le fonctionnement de riborégulateur et de perturber par la suite la synthèse des protéines essentielles chez la bactérie. (Khadija Marri , 2019)

III.2. Utilisation rationnelle des antibiotiques

La lutte contre l'apparition de résistance bactérienne aux antibiotiques passe logiquement par une réduction drastique de leurs utilisation et par l'amélioration de la pertinence de la prescription des antibiotiques (Éviter la répétition de l'exposition à un antibiotique chez un individu et limiter l'utilisation des classes d'antibiotiques particulièrement génératrices de résistances. Cela concerne notamment les antibiotiques à larges spectres (ex. : fluoroquinolones, C3G, carbapénèmes, amoxicilline-acide clavulanique) (Sophie Ziai ,2014) Même si la lutte contre l'antibio-résistance passe par une réduction drastique de leur utilisation, les antibiotiques doivent garder leur place dans notre thérapie.

III.3. Utilisation d'autres agents antimicrobiens contre les bactéries multi-resistantes

Dés que nos antibiotiques sont de moins en moins efficaces et le nombre d'infections causées par les bactéries multi-resistantes étant en nette augmentation en raison du développement de gènes de résistances chez les bactéries, la recherche des nouveaux agents antibactériens plus efficaces représente un des plus grands défis médicaux de nos sociétés à l'échelle mondiale

III.3.1. La phagothérapie

La phagothérapie est l'utilisation de virus bactériophages (phages) lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne.

Cette pratique tend à utiliser les propriétés du bactériophage comme prédateur naturel des bactéries Ils sont généralement très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement

quelques individus au sein de cette espèce, en plaçant ces phages si possible au contact sinon au plus proche des sites d'infections. (Khadija Marri , 2019)

III.3.2. La vaccination

La vaccination est importante pour lutter contre la résistance bactérienne, en effet les vaccins peuvent contribuer à limiter la propagation de la résistance aux antibiotiques. (La vaccination est un moyen très efficace d'éviter les infections et donc de devoir recourir à des ATB) (Anaïs Veyssiere , 2019)

III.3.3. Utilisation de bactériocines

Les bactériocines sont une famille de peptides ou protéines synthétisés naturellement par certaines bactéries. Une bactériocine consiste généralement en un composé protéique de 20 à 60 acides aminés.

Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés antibiotiques car elles peuvent être bactéricides ou encore bactériostatiques. Cette activité bactéricide ou bactériostatique est orientée contre certaines espèces proches de la souche productrice. (Anaïs Veyssiere , 2019)

III.3.4. Peptides antimicrobiens (AMPs)

Les peptides anti microbiens sont de petites molécules à caractère anti infectieux. Plus de 400 ont été décrits dans la littérature, mais ce sont les peptides cationiques et plus particulièrement ceux issus des mammifères ou d'origine humaine qui intéressent le plus les chercheurs. Parmi ceux-ci, on trouve les défensines la cathélicidine, l'histatine, l'indolicidine par exemple qui peuvent être utilisés lors d'infections pulmonaires, cutanées ou digestives. Ces peptides interagissent rapidement avec la membrane bactérienne provoquant la lyse de cette dernière et donc la mort de la bactérie. Ces petites molécules dont la synthèse est réalisable à coût raisonnable peuvent agir en synergie d'action avec les antibiotiques. (Khadija Marri , 2019)

III.3.5. L'apithérapie

Le miel est reconnu pour ses propriétés anti infectieuse, lorsqu'il y a lésion cutanée, il y a une phase inflammatoire, une phase de prolifération et une phase de remaniement des cellules cutanées. Le miel agit à chacun des niveaux avec en plus des propriétés anti infectieuse contre le *S. aureus* par exemple, *E. Coli* ou encore *P. aeruginosa*.

Ses propriétés anti bactérienne seraient dues à la présence de H₂O₂, de méthylglyoxal et de défensine-1 d'abeille dans le miel d'abeille. . Encore ici, on pourrait envisager d'accompagner le traitement d'une plaie par un antibiotique et l'apithérapie, des études restent à réaliser pour montrer la non infériorité de cette association face à l'antibiotique seul dans le cadre du traitement des plaies infectées. (Khadija Marri , 2019)

III.4. Autres stratégies

Les autres stratégies afin de lutter contre l'antibio-résistance sont multiples à savoir :

- Comprendre des mécanismes de résistance et d'adaptation des bactéries à leur environnement (cellule ou tissu hôte) et la surveillance de la propagation de ces phénomènes de résistance ;
- Application des méthodes récemment développées devra permettre d'avancer vers une médecine personnalisée par une utilisation des données génomiques du patient et des bactéries qui l'affectent ;
- La prévention de la diffusion par transmission croisée des BMR repose sur deux types de mesures : l'identification précoce des patients porteurs, et l'isolement des patients porteurs. qui peuvent être complétées par le traitement de certains réservoirs de BMR ; (Mehdi Saadaoui , 2008) Reformulation des antibiotiques dont le but essentiel est de mieux cibler l'infection, de diminuer les doses administrées en ayant des effets similaires et d'améliorer la stabilité et l'objectif ultime étant de palier au fléau de la résistance et ainsi augmenter l'efficacité.

IV. Les plantes étudiées

VI.1. *Centaurea jacea*

La *Centaurea jacea*, également appelée Centaurée jacée est une plante sauvage et vivace, dont les parties aériennes meurent après l'hiver (hémicryptophyte). herbacée de la famille des astéracées qui couvre toute la planète avec ses 23000 espèces. dressée, c'est une plante herbacée annuelle, bisannuelles ou vivaces, poilue et glabre. Plante vivace,

IV.1.1. Description botanique

La *Centaurea jacea* mesure entre 10 et 60 cm de hauteur dont les tiges sont rugueuses, en fleurs se développe en une touffe érigée un peu lâche, elle ne possède pas une fleur unique

mais un capitule de petites fleurs, Leur couleur va du rose au pourpre. Le tige est simple et rameuse à mi-hauteur, glabre ou pubescente mais pas blanche (aranéuse)

Ces feuilles sont rugueuses, entières, faiblement dentées et lancéolées. Elles sont de deux types : celles qui sont situées au bas des tiges sont plus grandes, ovales à lancéolées de 3.5 cm de large, attachées à la tige par un pétiole (pétiolées) et souvent découpées. Celles qui poussent le long des tiges sont plus petites, sessiles, lancéolées dépourvues de pétioles et entières.

Les fleurs sont de petites fleurs nombreuses en tube (tubulées) forment le capitule qui ressemble à une fleur. Celles de la périphérie sont évasées en entonnoir. La couleur est pourpre avec souvent un noyau blanc, Les capitules ont de 2 à 3 cm de diamètre et sont solitaires à l'extrémité des tiges. Les petites feuilles entourant le capitule ou bractées sont brunes et coriaces à l'extérieur. Elles font penser aux tuiles d'un toit ou aux écailles d'un poisson et sont dénommées « écailles ». L'extrémité des écailles n'est pas divisée ou peut être frangée. Ces écailles brunes recouvrent complètement la base qui est verte. (Blog de l'Association Nature Alsace Bossue ANAB,2019)



Figure 8. Quelques photos de *Centaurea jacea*(Blog de l'Association Nature Alsace Bossue ANAB,2019)

VI.1.2. Classification

Règne: Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Centaurea*

Espèce : *Jacea* (Quezel p., Santa S., 1963)

VI.1.3. Utilisation en médecine traditionnelle et activité biologique de la plante

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référenciées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle. Parmi les propriétés thérapeutiques reconnues chez les espèces de ce genre nous pouvons citer:

- Des propriétés contre le diabète (effet hypoglycémiant), la malaria, rhumatisme, et l'hypertension;
- Des pouvoirs diurétiques, antipyrétiques, cytotoxiques et antibactériens;
- Des propriétés anti-diarrhéiques.

(AZZOUZI Djihane ,2017)

VI.2. *Syzygium aromaticum*

VI.2.1. Description botanique

Le giroflier est un grand arbre au tronc gris clair de 12 à 15 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut .Il présente un port érigé et pyramidal). Son feuillage est aromatique, coriace, persistant vert sombre et vernissé au revers plus clair. Ses feuilles sont opposées, entières, elliptiques,d'environ 10-12 cm à nervure médiane marquée et parsemées de glandes sur le revers.

- Les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*): Ils sont des boutons floraux qui sont récoltés une à deux fois par an, avant l'épanouissement, lorsque les sépales deviennent rouge vif, on les sèche au soleil jusqu'à obtenir une coloration brune.
- L'huile essentielle de la plante est de clous de girofle se présente sous la forme d'un liquide huileux de couleur jaune fonçant au brun à la lumière. Elle est obtenue par

hydro distillation. L'huile essentielle des clous de girofle contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85 % de l'acétate d'eugénol, 4 à 10 % du β -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits (dont un peu de vanilline)



Figure 7. Quelques photos de *Syzygium aromaticum* (Ouidir Soraya,2018 ; Adouane Selma,2016)

(A) la plante entière, (B) Boutons floraux et fleurs de giroflier., (C) Clou de girofle

VI.2.2.Classification botanique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta* (Phanérogames)

Sous-embranchement : *Magnoliophytina* (Angiospermes)

Classe : *Magnoliopsida* (Dicotylédones)

Sous-classe: *Rosidae*

Ordre: *Myrtales*

Famille: *Myrtaceae*

Genre: *Syzigium*

Espèce : *S. aromaticum*

(Quezel p., Santa S., 1963)

Nom français: Clou de girofle

➤ Nom arab: Koronfol

➤ Nom local: Tib

VI.2.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs: ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion. (Ouidir Soraya,2018).

les clous de girofle sont aussi utilisés pour démêler les cheveux en douceur, pour préparer l'accouchement... (Adouane Selma,2016)

VI.3. *Thymus. sp*

V. 3.1. Description botanique

Les thymus (*Thymus.sp*) sont des sous arbrisseaux ligneux, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont couvertes de poils tecteurs et sécréteurs (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose

- **Huile essentielle**

Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques du genre *Thymus*. Ainsi que le para-cymène, 1,8 cinéol et le linalol. Les huiles essentielles contiennent aussi d'autres

monoterpènes et sesquiterpènes tel que: α , γ terpinène- β ,E-caryophyllène-Oxyde de caryophyllène- β pinène-Camphre-Bornéol-Terpinolène.

VI.3. 2.Classification

Nom scientifique *Thymus sp.*

Noms vernaculaires

-Français:thym des jardins,Farigoule,frigoule,barigoule

-Anglais:commonthyme, gardenthyme

-Arabe:زعتر



Figure 10 photo de *Thymus. sp*

kabyle:Tizaatarte, Tizerdite

Systématique

Règne:Plantae

Embranchement:Magnoliophyta

Classe:MagnoliopsidaSous classe:Asteridae

Ordre:Lamiales

Famille:Lamiaceae

Genre:*Thymus*

VI. 3.3. Usage et propriétés thérapeutiques Traditionnellement

L'huile essentielle est largement utilisée en aromathérapie comme antiseptique. Elle entre dans la composition de diverses spécialités (pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops

pour le traitement des affections des voies respiratoires, préparations pour l'antisepsie buccale). Le thym est utilisé sous forme de bains aromatiques ainsi qu'en traitement complémentaire en cas d'affections aiguës ou chroniques des voies respiratoires ou de prurit lié à une dermatose. On l'utilise aussi en frictions, diluée à 10 %, pour traiter les douleurs rhumatismales et les névralgies .

V. Les métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires des plantes sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques, microorganismes pathogènes...etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre. Ils sont différents dans les différentes espèces. (Livendron J, 1996)

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes.

L'isolement de principes actifs au XIX^{ème} siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

V.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques de faibles poids moléculaires d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes.

Ils sont connus comme doués de propriétés antimicrobiennes. Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'insérer avec l'ADN. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine), ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). Ils sont utilisés comme inhibiteurs des pompes à efflux afin de lutter contre l'antibio-résistance (Toure Daouda , 2015)

V.2. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes. Le mécanisme des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile. Pour la résistance bactérienne aux antibiotiques ces métabolites sont utilisés comme inhibiteurs des transporteurs d'antibiotique (inhibiteurs des pompes à efflux) et ainsi provoquant la perméabilité des membranes bactériennes. (Toure Daouda , 2015)

V.3. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. (Toure Daouda , 2015)

V.4. Les composés phénoliques

Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes. (Toure Daouda , 2015)

V.4.1. Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti-oxydantes et anticoagulante.

V.4.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Le terme flavonoïde provient du latin "flavus", signifiant "jaune", ils sont des pigments polyphénoliques presque toujours hydrosolubles qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaunes ou en blanc. Ils ont un champ d'action important et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes, leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité

des lipides membranaires. En effet, ils sont capables d’inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *proteus mirabilis*. (Toure Daouda , 2015)

V.4.3. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires à haut poids moléculaire. (Cowan M.M., 1999)très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones (Akroum S., 2011) existent dans presque chaque partie de la plante : feuilles, fruits et racines, ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (Cowan M.M., 1999); Les tannins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections (Attou A., 2011). Ils sont divisés en deux groupes :

- Tannins hydrolysables qui sont des esters d’un sucre (généralement le glucose) et d’un nombre variable de molécules d’acide phénolique (acide gallique ou acide hétéroxydiphénique (HHDP));

Tannins condensés qui sont formés par la condensation des unités flavan-3-ols et flavan-3-4-diols (Bruneton J, 1999).

VI. Les bactéries étudiées

Le tableau ci-dessous dans la page suivante montre les différentes caractéristiques des souches bactériennes étudiées.

Tableau 4 : Différentes caractéristiques des souches bactériennes étudiées

Les souches	Forme	Type	Culture	Famille	Habitat
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Bacille immobiles et capsulés	Gram négatif	aérobie-anaérobie facultatif	Enterobacteriaceae	Bactérie commensale du tube digestif de l’homme et des animaux à sang chaud et peut se trouver dans l’eau, le sol et la poussière mais c’est un agent pathogène responsable d’infections variées.

<i>Escherichia coli</i>	bacille mobile	Gram négatif	aérobie-anaérobie facultatif	Enterobacteriaceae	Elle compose en grande partie notre flore intestinale (bactérie commensale) mais aussi des animaux cependant elle est pathogène, l'infection se fait par contact direct ou via des contaminations fécales.
<i>Enterobacter spp</i>	bacille mobile	Gram négatif	aérobie-anaérobie facultatif	Enterobacteriaceae	L'intestin de l'homme et des animaux, elle est aussi trouvé dans les selles, les eaux d'égouts, le sol, Certaines souches du genre Enterobacter peuvent être responsables d'infections nosocomiales
<i>Staphylococcus aureus</i>	coque immobile	Gram Positif	aérobie-anaérobie facultatif	Staphylococcaceae	<i>S. aureus</i> est un pathogène opportuniste dans certaines circonstances mais n'est pas considéré comme commensal à proprement parlé contrairement à <i>Staphylococcus epidermidis</i> .
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille très Mobile.	Gram Négatif	non fermentant aérobie strict	Pseudomonadaceae	Bactérie ubiquiste : eaux (douces, salées, et milieux humides), denrées alimentaires, lavabos, fleurs, certains antiseptiques, ... Ces bactéries sont à l'origine d'infections

Chapitre II :

MATERIELS ET METHODES

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'investigation *in vitro* de l'effet de l'association de l'antibiotique avec des extraits de la plante médicinale *Centauria jacea* (polythérapie) et avec l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur des bactéries pathogènes résistantes (présentant le phénotype multi-drogue résistance (MDR)). La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de microbiologie, Université Abbés Laghrour - Khenchela.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)

I.1.1. Plantes médicinales et huiles essentielles

A. *Centauria jacea*

L'espèce *C. jacea*, a été récoltée dans la région de Mila en Mai 2020 et identifiée par Mme Kara Ali. W Docteur à l'université Abbés Laghrour de Khenchela et membre dans l'équipe de Physiopathologie cellulaire et plantes médicinales dans le laboratoire de biologie et de l'environnement à l'université des frères Mentouri Constantine 1.

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de la plante *C. jacea* fraîchement récoltées, ont été débarrassées de tous éléments étrangers, ensuite ils ont été séchées à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil. Enfin, elles ont été pulvérisées au broyeur pour obtenir des poudres fines qui ont été ensuite conservées jusqu'à l'utilisation ultérieure pour les différentes extractions.

B. Huiles essentielles utilisées

Les huiles essentielles que nous avons utilisées afin de tester leur effet inhibiteur contre des souches résistantes aux antibiotiques sont:

- L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui a été achetée à la pharmacie Zeitipharm dans la wilaya de Batna situé dans le Nord-Est de l'Algérie ;
- L'huile essentielle de *Thymus sp* qui a été provenu du laboratoire de phytochimie et d'analyses physicochimiques et biologiques de l'université des Frères Mentouri, Constantine 1.

I.1.2. Les souches bactériennes

Afin de tester l'effet inhibiteur des extraits (méthanolique et butanolique) de plante médicinale *C.jacea* et l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* contre la résistance bactérienne aux antibiotiques cinq souches largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme dont quatre Gram négatif et une souche Gram positif ont été utilisées.

Toutes les souches sont des bactéries isolées d'un milieu clinique au laboratoire privé de IBN ENNAFIS qui se situe au centre ville de la wilaya de Khenchela , à partir des prélèvements urinaires.

Le tableau ci-dessous montre la liste des bactéries testées

Tableau 5 :Liste des bactéries testées et leur source

Type	Espèce	famille	Source
Bactéries à Gram négatif	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	Urine
	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	Urine
	<i>Enterobacter spp</i>	Enterobacteriaceae	Urine
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Urine
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Urine

Avant l'utilisation, les souches ont été toutes conservées à la température ambiante dans un milieu de conservation approprié (tubes contenant 3 ml de milieu incliné géloses de conservation).

I.1.2. Les antibiotiques

Les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais d'inhibition de la résistance sont indiqués dans le tableau ci-dessous

Tableau 6 :Antibiotiques utilisés pour les essais d'inhibition de la résistance bactérienne

Famille d'ATB	Disque d'ATB testés	Abréviations	Charges (µg)
Béta-lactamines	Aztréonam	ATM	30
	Pénicilline	P	30
	Ceftazidime	CAZ	30
	Piperacilline	PRL	100
Macrolides	Erytromycine	E	15
	Spiramycine	SP	100
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
Aminosides	Kanamycine	K	10
Nitrofurane	Nitrofurantoïne	F	10
Polymyxines	Colistin sulfate	CT	10

Tous ces antibiotiques sont **Ankara/TURKEY** par **BIOANALYSE Tibbi Malzemeler San.ve Tic. Ltd. Sti .**

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, acide *sulfurique* (H₂SO₄), HCl, acide acétique, NaOH, NH₄OH, KI, I₂, NaCl, BaCl₂, AlCl₃, diméthyl sulfoxyde (DMSO), méthanol, n-butanol, Éther de pétrole,acétate d'éthyle, chloroforme proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER COURMAT), Bain Marie (MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT),Agitateur magnétique (SCIOGEX), vortex (VELP), Autoclave (SANO. Clav) et Balance (OHAUS).

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits végétaux

II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de la plante *C. Jacea* ont été bien nettoyées et séchées à température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 15 jours. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation. La méthode de Markham (1982) était suivie pour la préparation d'extrait méthanolique; 150 g de la poudre végétale est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcoolique; méthanol /H₂O (7:3) pendant une nuit (macération alcoolique). Cette technique est effectuée 5 fois, suivie chaque fois d'une filtration. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à 55 °C dans un Rotavapeur (HAHNVAPOR) pour obtenir l'extrait brut méthanolique (figure 9).

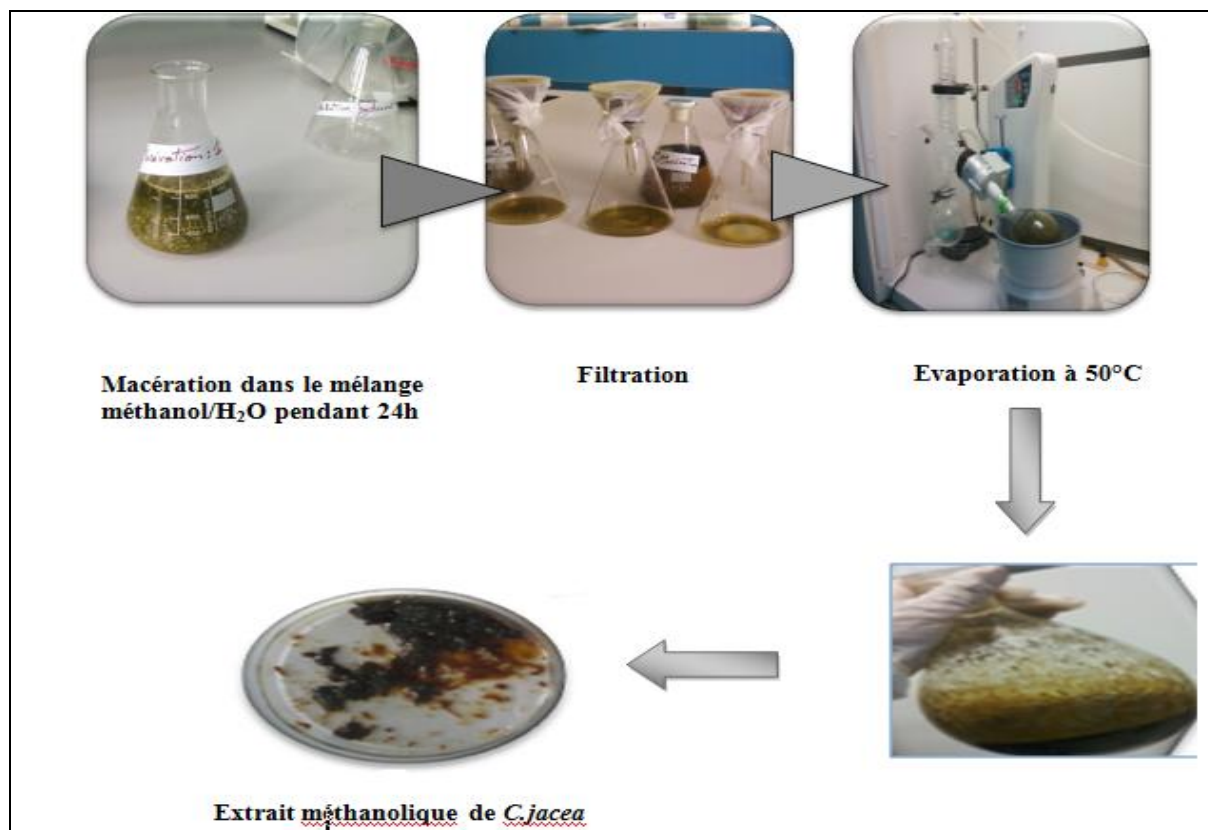


Figure 11. Les étapes de préparation de l'EMCJ de la plante *C. jacea*

II.1.2. Préparation de l'extrait des flavonoïdes totaux

Afin d'extraire l'ensemble des flavonoïdes (aglycones et glycosylés), nous avons adopté la méthode de Harborne (1975) selon laquelle, un poids de 200 g de la poudre végétale (tiges, fleurs et feuilles) est mis en macération dans 1000 ml du mélange méthanol/ eau (7 / 3) (V/V) pendant 24 heures puis filtré. Cette étape est répétée quatre fois avec le même mélange de solvants, la quatrième macération est chauffée. Le filtrat total obtenu est évaporé à moins de 60°C à sec et le résidu d'évaporation est macéré dans l'eau bouillante pendant une nuit, puis filtré par un papier filtre.

La deuxième étape consiste en l'affrontement de la phase aqueuse obtenue au n-butanol. Dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse obtenue de la filtration est mélangée avec du n-butanol, après agitation puis décantation, deux phases ont été obtenues; une phase organique (butanolique) en haut et une autre aqueuse plus dense en bas. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse subit un deuxième affrontement par le même solvant qu'est le n-butanol pour extraire le maximum de substances flavonoidiques. Enfin, la phase organique totale obtenue est évaporée à sec à 65°C par un évaporateur rotatif. Le résidu d'évaporation représente donc l'extrait des flavonoïdes totaux qui sera utilisé dans cette étude.

Le déroulement de la procédure d'extraction des flavonoïdes totaux est représenté dans la **Figure 10**

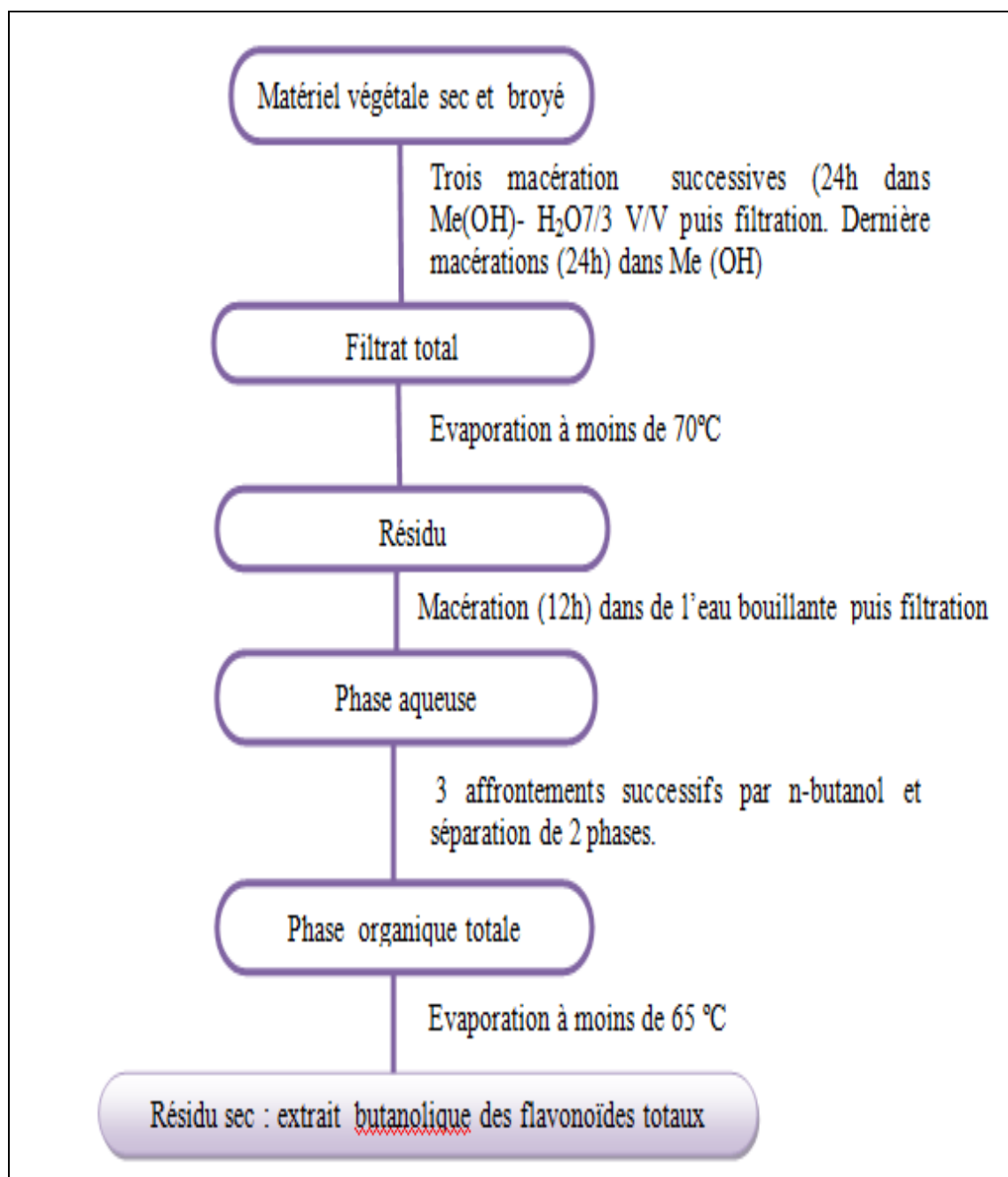


Figure 12. Etapes d'extraction des flavonoïdes totaux

II.2. Screening phytochimique

II.2.1. Screening phytochimique dans l'extrait méthanolique

Le screening phytochimiques des différents métabolites secondaires a été réalisé sur l'extrait méthanolique (EMCJ) (Tableau 7)

Tableau 7. Tests de screening phytochimique dans l'extrait méthanolique

Métabolites	Méthode	Résultats attendus	Les références
Flavonoïdes	5 ml extrait + quelques gouttes d' AlCl_3 (1%).	Apparition d'une couleur jaune.	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Polyphénols	2 ml extrait+ quelques gouttes de FeCl_3 à 2%.	Apparition d'une couleur bleue –noirâtre ou vert foncé.	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Alcaloïdes	- Extrait + 5 ml d' HCl (2N) au résidu. - Chauffer dans un bain marie - Filtrer le mélange -Ajouter le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). (101).	La présence de turbidité ou de précipitation	(Benmahdi A., 2001)
Tanins totaux	2 ml de la solution d'extrait+ 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%.	Apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité après quelques minutes.	(Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO, 2004)
Tanins galliques	5 ml de l'extrait+2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3	Apparition d'une coloration Bleu foncé.	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Saponosides	Test 1: 5 ml d'extrait ont été bien mélangé avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min.	La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides.	(Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., 2004)

	Test 2: 5 ml de l'extrait ont été mélangé avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré.	Apparition d'une couleur rouge-marronne de la couche d'interface	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Composés réducteurs	1 ml de l'extrait + 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl ₃ +5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl ₃ .	la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique).	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Anthocyanes	5 ml de l'extrait+quelques gouttes de HCl	Apparition d'une couleur rouge	Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., 2004
Irridoïdes	2 ml de l'extrait+ quelques gouttes d'HCl. Chauffer sur plaque chauffante quelques minutes	Apparition d'une couleur bleu	Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., 2004
Mucilages	1 ml d'infusé+5ml d'alcool absolu pendant 10 min	Formation d'un précipité	Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., 2004
Sucres réducteurs	5 ml d'extrait+5ml de réactif de Fehling Le mélange a été chauffé dans un bain-Marie pendant 3 min	Formation d'un précipité rouge brique.	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005)
Caroténoïdes	10ml d'extrait+3ml d'HCl et 3ml de H ₂ SO ₄	Apparition d'une couleur Vert-bleu	(Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO.,2005)

II.2.2. Screening phytochimique dans l'extraitbutanolique

Le screening phytochimique des différents classes des flavonoïdes a été réalisé sur l'extrait **Butanolique (EBCJ)**

II.2.2.1. Mise en évidence des anthocyanes

2 ml d'extrait a été traités avec 2ml de HCl (2N) et quelques gouttes de NH₄OH. Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (Mellouk, 2013).

II.2.2.2. Mise en évidence des flavonols

0,5 ml du HCl concentré ont été additionnés à 5 ml d'extrait. La couleur rouge pourpre après incubation dans un bain marie pendant 30 minutes, à température entre 80 –90 C° indique la présence des flavonols (Guessoum et Lecheheb, 2015).

II.2.2.3. Mise en évidence des flavones

Quelques gouttes de KOH ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur orange indique la présence des flavones (Mellouk, 2013).

II.2.2.4. Mise en évidence des flavonones

Quelques gouttes de FeCl₃ ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur rouge violacé indique la présence des flavonones. Si le résultat est négatif cela indique la présence de chalcone ou isoflavone (Mellouk, 2013).

II.3. Etude quantitative des extraits

II.3.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes dans l'extrait de la plante CJ ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium; 1 ml de chaque extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y = ax + b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 µg / ml, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoides. La teneur en flavonoides à été exprimé en milligrammes équivalents de quercitrine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E).

(Boharun T., Gressier B., Trotin F., et Al, 1996)

II.3.2. Dosage des polyphénols

La concentration des polyphénols dans l'extrait de CJ a été déterminée par l'utilisation d'une méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu's; Brièvement, 0.5 ml de l'extrait (dilués dans le méthanol) à la concentration de 1 mg/ml a été ajouté à 2.5 ml de réactif de Folin-

Ciocalteu's à 10% (dilués dans l'eau et 2.5ml de NaHCO₃ à la concentration de 7.5 %). Le blanc a été préparé au même temps par 0.5 ml méthanol, 2.5ml de réactif Folin-Ciocalteu's à 10% (dilués dans l'eau et 2.5ml de NaHCO₃ à la concentration de 7.5 %). Les échantillons ont été ensuite incubés dans une étuve à 45°C pendant 45 min.

L'absorbance a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765nm. Les échantillons ont été préparés en triple pour chaque analyse et la valeur moyenne d'absorbance a été obtenue. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (pratiqué dans les mêmes conditions de l'extrait) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg of GA/g extrait).

(Stanković MS, 2011)

II.4. Etude quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -R_f- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures.

II.4.1. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées afin d'identifier la composition d'extrait méthanolique de en flavonoïdes, tanins et saponosides dans l'extrait méthanolique la plante *C. Jacea* sur des plaques desilica gel, sur support rigide en aluminium; 20/20cm.

Les extraits méthanoliques et butanoliques de la plante *C. jacea* sont déposés à l'aide d'une micropipette (2 µl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. Ensuite, les plaques sont placées dans les cuves de développement dans lesquelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation des phases mobiles (Tableau 8)

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées soit sous lampe UV à 254 et 365 nm (Flavonoïdes) ou par l'utilisation d'un révélateur

(Saponosides et Tanin). Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les R_f (Vanhaelen M, Vanhaelen-Fasté R. 1980)

Les phases mobiles et les systèmes de révélations utilisées pour la séparation des différents composants contenus dans l'extrait méthanolique de *C.Jaceasans* présentées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 8 : Les phases mobiles et les révélateurs utilisées pour la séparation des Flavonoïdes, saponosides et tanins dans l'extrait méthanolique de C.Jacea

Composants	Phase mobile		Révélateur
Flavonoïdes	Test 1	Toluène/ Acétate d'éthyl /Déchlorométhane (6/4/1)	Lampe UV 254/365nm
	Test 2	Butanol Acide acétique/ Eau distillé (4/1/5)	
Tanins	Toluène / acétone /Acide acétique (5/5/1)		Chlorure de fer (2 %)
Saponosides	Toluène/ Méthanol / Déchlorométhane (4/5/1)		Acide sulfurique 3, puis séchage dans l'étuve à 110° pendant 10mn.

II.4.2. Calcul du Rapport frontal

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant/ la distance parcourue par le solvant. Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des différents composants séparés.

II.5. Etude de l'effet des extraits sur l'antibio-résistance

Dans le présent test, nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disques décrite par Bauer.
(Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T. C and Truck M., 1966)

II.5.1.Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance des souches bactériennes (*Klebsiella Pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton. Des antibiotiques (Pénicilline, Aztréonam,

Ceftazidime, Piperacilline, Erytromycine, Spiramycine, Tétracycline, Acide Kanamycine, Nitrofurantoïne et Colistin sulfate) communément utilisés en thérapie humaine ont retenus pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton. Des disques de chaque antibiotique ont été déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir de disque en créant un gradient de concentration décroissante. Les caractères de sensibilité ou de résistance des souches bactérienne ont été déterminés par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition.

Le mode opératoire est pratiqué selon la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS.

- Milieu de culture : C'est la gélose Mueller Hinton (MH), coulé en boîte de pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont séchées avant l'emploi.
- Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure sur milieu gélosé des bactéries à tester (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mack Ferland (voire Annexe) ($DO=0.08-0.10$ lue à 625nm). L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

- L'ensemencement : Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton (voire Annexe), Couler 20ml de la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Application des disques d'antibiotiques: on a déposés les disques en utilisant une pince bactériologique stérile. On a pressé le disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application.
- La lecture : Une fois la période d'incubation écoulée, la zone entourant le disque ou aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. La souche est ainsi classée sensible(S), intermédiaire(I), ou résistante (R) à l'antibiotique.

II.6.2. Valorisation de l'effet inhibiteur des extraits de *C.jacea* et de l'huile essentielle de *S. aromaticum* contre l'antibio-résistance par la méthode des disques

L'étude du pouvoir inhibiteur de l'antibio-résistance des souches bactérienne par cette méthode est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est l'utilisation des disques d'antibiotiques imprégnés par les extraits de la plante *C.jacea* (EMCJ et EBCJ) ou l'huile essentielle de *S.aromaticum*.

(Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T. C and Truck M., 1966)

II.6.2.1. L'ensemencement

Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton (voir Annexe), qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Couler 20ml de la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

NB. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

II.6.2.2. Préparation des disques d'aromatogramme

Stériliser du papier Wattman n°3 coupé en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes;

Trois types de disques ont été utilisés :

- Disques d'antibiotiques seul;
- Disque de l'extrait seul (10µl à la concentration de 100 mg/ml) pour EMCJ et EBCJ ou de l'huile essentielle (10µl à l'état brute)
- Disque de l'association antibiotique-extrait ou antibiotique-huile essentielle où des disques d'antibiotique ont été imprégnés soit par 10µl d'extrait (EMCJ ou EBCJ) à une concentration de 100mg/ml repris dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par 10 µl/ml huile essentielle de *s.aromaticum* à l'état brute;
- Disques de contrôle négatif imprégnés de diméthylsulfoxyde (DMSO);

Les disques sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.

II.6.2.3. Incubation et lecture

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) sont mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 ou 48 heures selon le germe.

Les expériences ont été réalisées en trois répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (standard déviation). La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).

II.7. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple, Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm (déviation standard (n=3)).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Screening phytochimique

Dans le but d'étudier l'effet inhibiteur de la résistance aux ATB des souches utilisées par les extraits des plantes (EMCJ et EBCJ) et des huiles essentielles de *Thymus.sp* et de *Syzygium aromaticum* ; on a fait plusieurs travaux *in vitro* pour obtenir les résultats suivants :

I.1. Screening phytochimique dans l'EMCJ

Les tests phytochimiques réalisés sur l'EMCJ révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le (Tableau 9) et les photos ci dessous.

Tableau 9 : Screening phyto-chimique préliminaire dans l'EMCJ

Alcaloïdes	+ présence d'une turbidité
Sucres réducteurs	+ présence d'une couleur rouge brique foncée
Tanins totaux	Test 1 : + un précipité
	Test 2 : ± (vert foncé)
Tanins galliques	± (vert foncé)
Saponosides	Test 1 : -
	Test 2 : -
	Test du tableau : + précipité blanc
Flavonoïdes	+
Coposés réducteurs	-
Anthocyanes	-
Irridoïdes	-
Mucilages	-
polyphénols	+ coloration vert foncé
Caroténoïdes	+ coloration vert bleu

Les résultats sont interprétés comme suit : (+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives

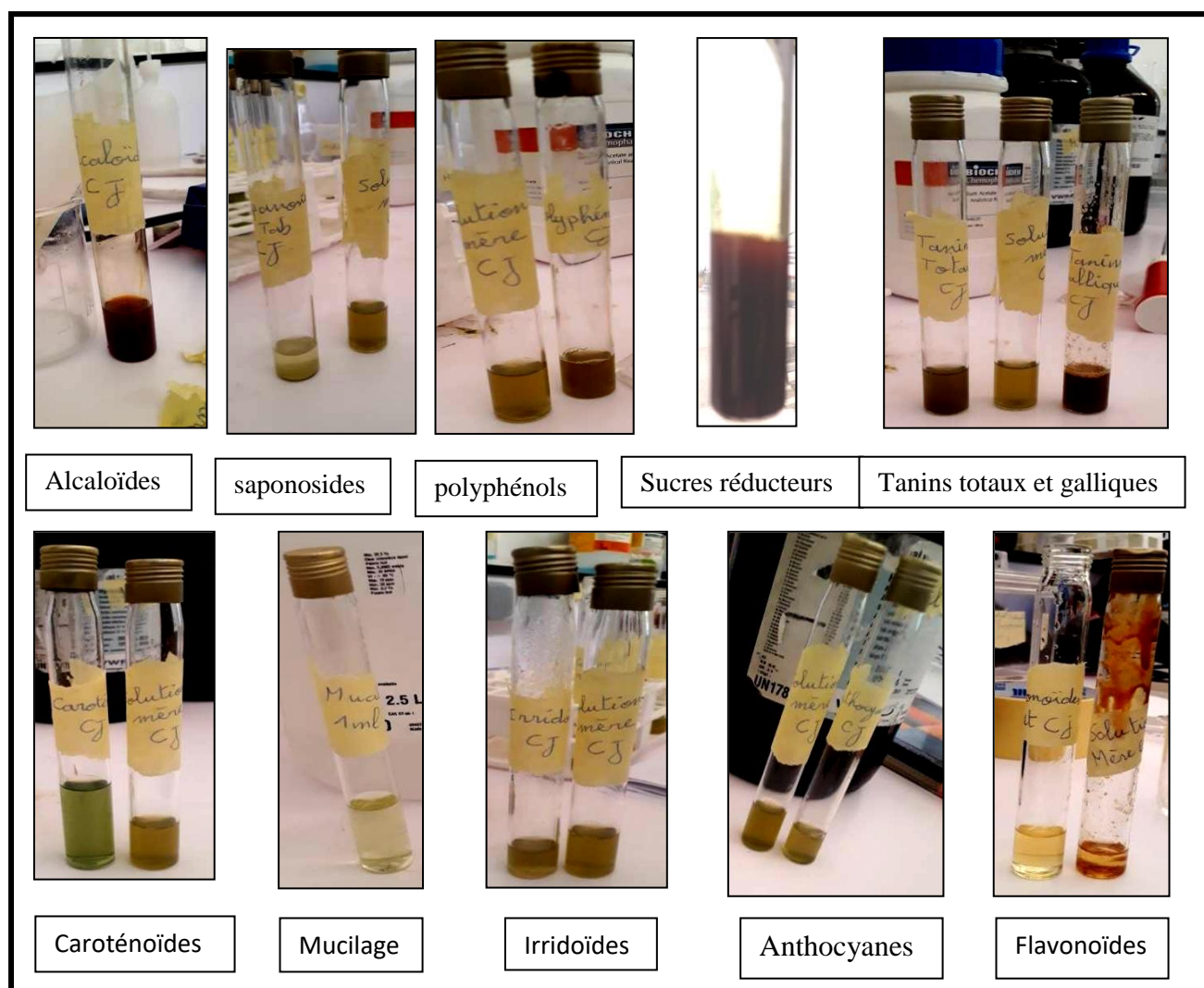


Figure 11. Résultats obtenus *in vitro* des tests phytochimiques de l' : EMCJ

L'étude phytochimique d'EMCJ a montré que cette plante contient : des flavonoïdes, des alcaloïdes, des sucres réducteurs, des polyphénols, des caroténoïdes, des saponosides et des traces des tanins totaux et galliques. Ce qui confirme les travaux qui ont été révélés la richesse de l'extrait méthanolique en composés chimiques actifs qui pourraient expliquer son utilisation traditionnelle depuis longtemps dans la médecine populaire contre plusieurs maladies tels que le diabète, la malaria ainsi que les maladies de la peau et du foie. Récemment plusieurs espèces du genre *Centaurea* font le sujet d'une large investigation phytochimique en raison de leur richesse en métabolites secondaires connues pour leurs diverses activités biologiques très importantes: anti tumeur, cytotoxique, antimicrobienne, hypothermique.(Barkat El houaria Belbey Meriemet Al,2017)

I.2. Screening dans l'EBCJ

Le tableau 10 représente les tests de mise en évidence des flavonoïdes dans l'EBCJ :

Tableau10 : Les tests de mise en évidence des flavonoïdes :

Types de flavonoïdes	Présence des flavonoïdes dans EBCJ	Couleurs	Interprétation des résultats
Flavonoïdes	+	couleur jaune	Présence des flavonoïdes
Anthocyanes	-	Pas de virage de couleur	Absence des anthocyanes
Flavonols	±	Couleur marron	Présence de traces des flavonols
Flavones	+	Couleur orange	Présence des flavones
Flavonones	-	Couleur Bleu nuit	Présence de chlacone ou isoflavones

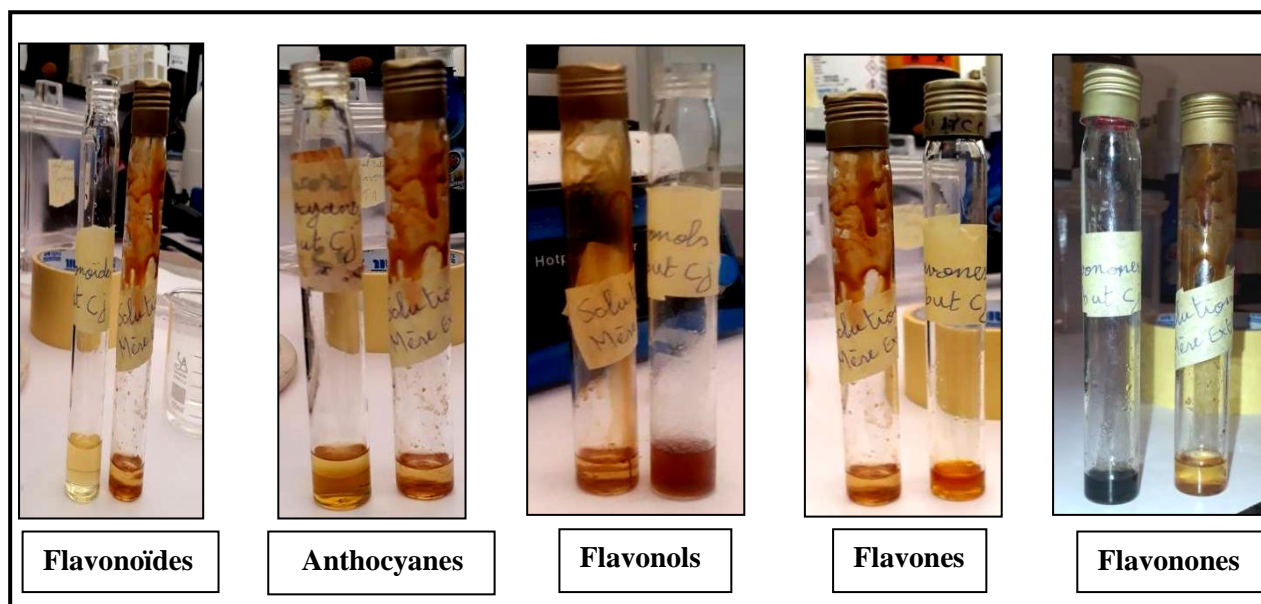


Figure12. Tests de mise en évidence des flavonoïdes

D'après les résultats obtenus l'EBCJ contient un nombre important de flavonoïdes (des flavones, des traces de flavonols, des chlacones ou des isoflavones).

Le genre *Centaurea* est une source importante dans le règne végétal qui produit de nombreux produits naturels : notamment les flavonoïdes qui sont connus pour leurs activités biologiques diverses notamment l'activité antioxydant et l'activité cytotoxique. Suggérant que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. (Merzouk Meriem , 2019)

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont possédé une activité antimicrobienne [32], les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [33]

[32] (C.T.P.Tim and J.L.Andrew. 2005)

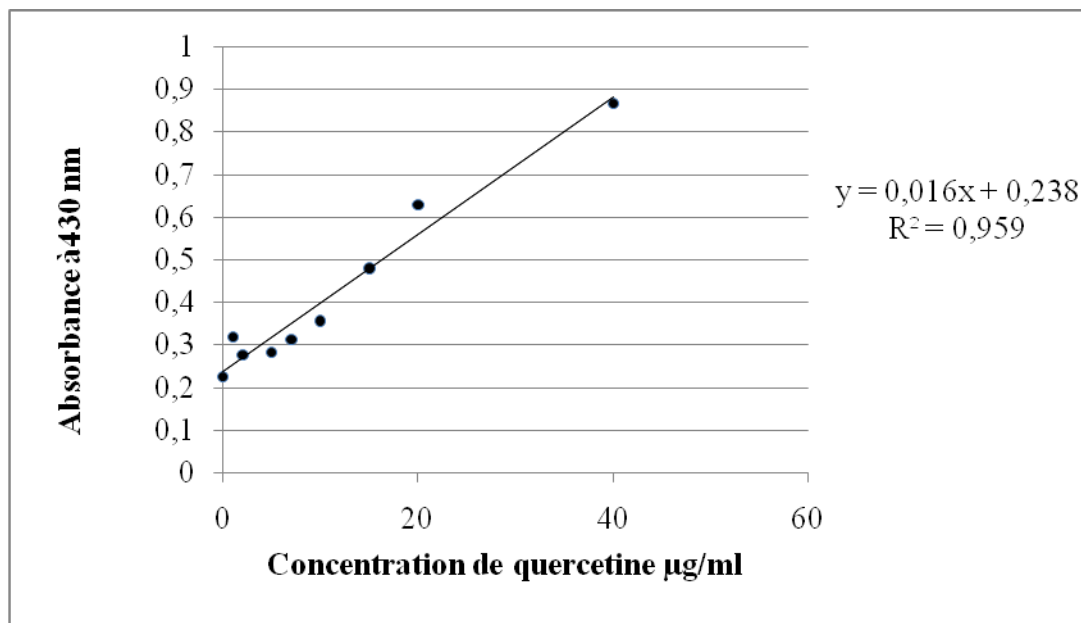
[33] (M.Cowan,1999)

II. Etude quantitative des extraits de *C.Jacea*

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de la partie aérienne de *C.Jacea*, un dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux a été effectué. Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Beta et al., 2005;. Meddour, 2013).

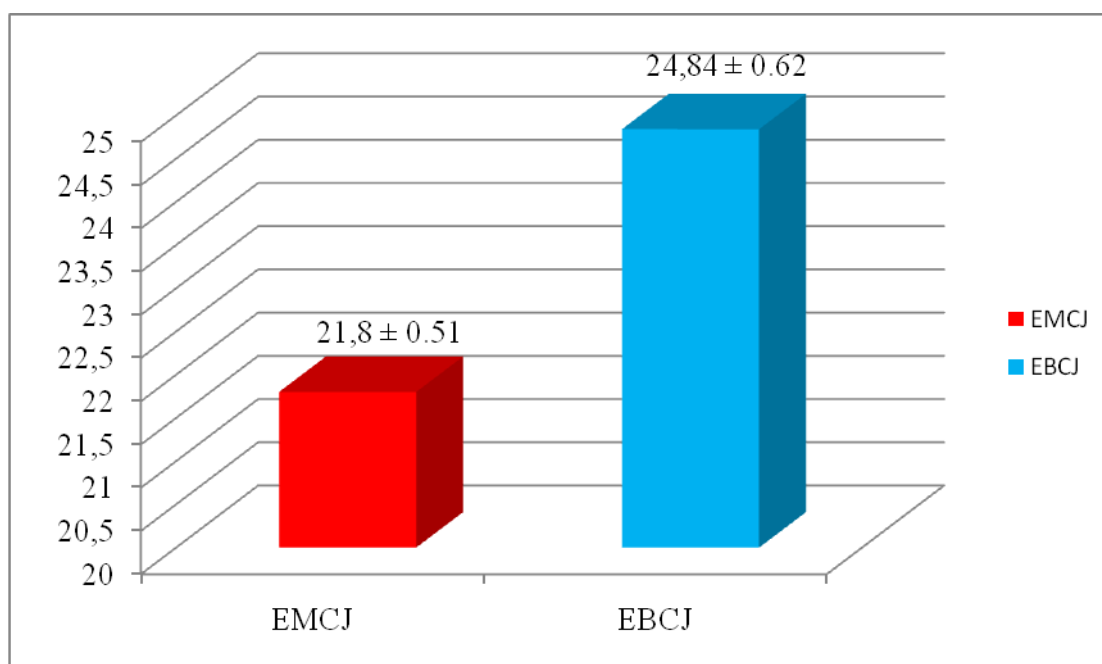
II.1.Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans EMCJ et EBCJ a été effectué au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Une courbe d'étalonnage (Figure 13) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentrations. Des mesures de densité pour chaque extrait ont été réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (Figure 14) et déterminés par l'équation de type: $y=a x + b$



Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3)

Figure 13. Courbes d'étalonnage de la quercétine



Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

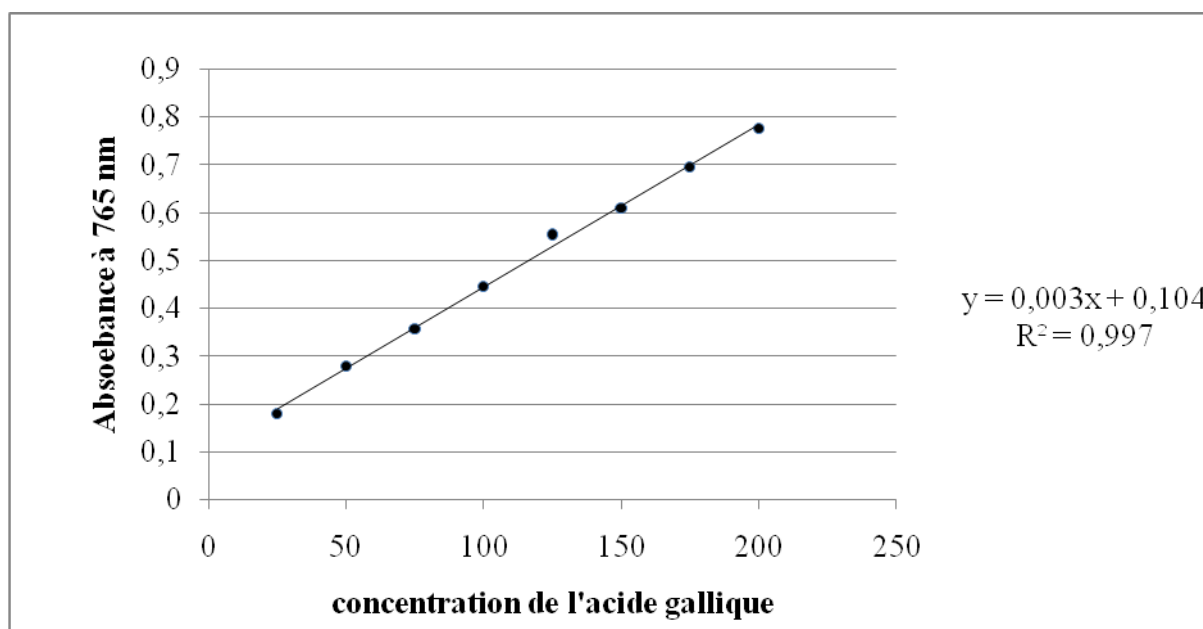
Figure 14. Teneur en flavonoïdes totaux dans EMCJ et EBCJ (mgEQ/gE)

Suivant la figure ci-dessus, les teneurs en flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait sont: 21.8 mgEQ/gE et 24.84 mgEQ/gE, respectivement avec l'extrait méthanolique et butanolique.

L'extrait butanolique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes en comparaison avec l'extrait mutanolique.

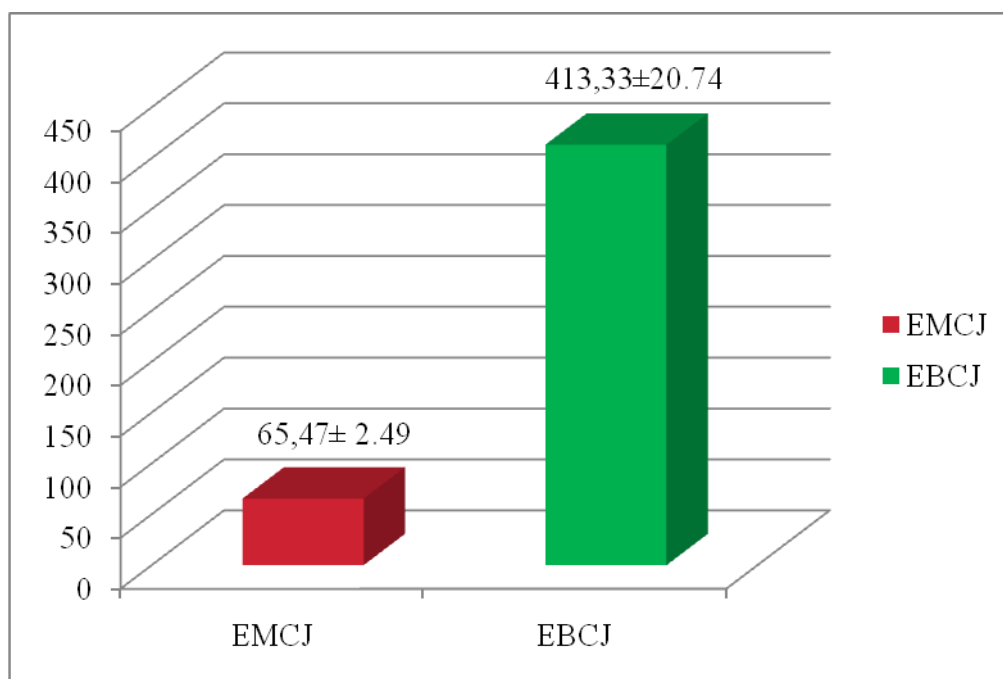
II.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique et l'extrait butanolique de *C.Jacea* a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu's. Une courbe d'étalonnage (Figure 15) a été tracée pour cet objectif, établie avec l'acide gallique comme standard à différentes concentrations. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait (Figure 16) et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$



Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3)

Figure 15. Courbes d'étalonnage de l'acide gallique



Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Figure 16. Teneur en polyphénols totaux dans EMCJ et EBCJ (mgEQ/gE)

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique contient (65.47 mg EQ/g d'extrait). Cependant, la teneur en polyphénols dans l'extrait butanolique est de (413 mg EQ/g d'extrait).

Les résultats de l'étude quantitative montrent que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes, ceci suggère que les polyphénols présents dans l'extrait ne sont pas tous des flavonoïdes, il peut y avoir présence d'autres polyphénols tels que les tanins qui ont été mis en évidence dans le screening phytochimique.

La teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs tels que, les conditions climatiques des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires, notamment les polyphénols), le moment de la récolte, le solvant d'extraction, les conditions de stockage (Podsedeck, 2007; Falleh et al., 2006).

II.3. Etude quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM

La chromatographie est une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, identification et dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Cette

technique repose principalement sur des phénomènes d'absorption et d'interaction. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire. L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil. Après que l'échantillon ait été déposé, les substances migrent par capillarité. La vitesse dépend des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. Les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (Mamadou Aïssa Jazy,2018)

• Le choix de la phase mobile

Plusieurs systèmes de solvants sont exploités durant cette manipulation, le choix de système est basé sur ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations). Pour avoir les empreintes flavoniques et tannique et saponosidique des deux extraits (butanolique , méthanolique) de la plante *centaurea jacea* et avoir une idée sur les bons systèmes de séparation et isolement. On a essayé plusieurs systèmes solvants et on a gardé celui qui donne autant de taches.(Houazene Mounira, Alem Ouerdia ,2017)

II.3.1.Séparation des flavonoïdes par CCM

Pour l'identification des flavonoïdes, nous avons utilisé deux tests (**Tableau 9**)

La révélation est faite sous une lampe à UV (Ultra Violet) qui met en évidence la présence des flavonoïdes. Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal R_f , calculé par la formule suivante : $R_f = d/D$

d : la distance parcourue par la molécule ;

D : la distance parcourue par la phase mobile (front du solvant).

Tableau 11. Résultat de la séparation des flavonoïdes CCM (EMCJ)

Adsorbant : gel de silice

Système solva	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)	Type flavonoïde possible (Maroua Ferhat ,2019)
toluène , acétate d'éthyl ,déchlorométhane (6V/4V/1V)	rose	0.76	Anthocyanidine 3- glycosides
mélange butanol acide acétique et d'Eau distillé dans les proportions (4V/1V/5V)	Bleu blanc fluorescent	0.357	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
	Bleu vif	0.93	Acide phénol
	rose	0.92	Anthocyanidine 3- glycosides

Tableau 12. Résultat de la séparation des flavonoïdes par CCM (EBCJ)

Adsorbant : gel de silice

Système solvant	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)	Type flavonoïde possible
toluène , acétate d'éthyl ,déchlorométhane (6V/4V/1V)	Bleu blanc fluorescent	0.14	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
mélange butanol acide acétique et d'Eau distillé dans les proportions (4V/1V/5V)	Bleu blanc	0.92	Acide phénol

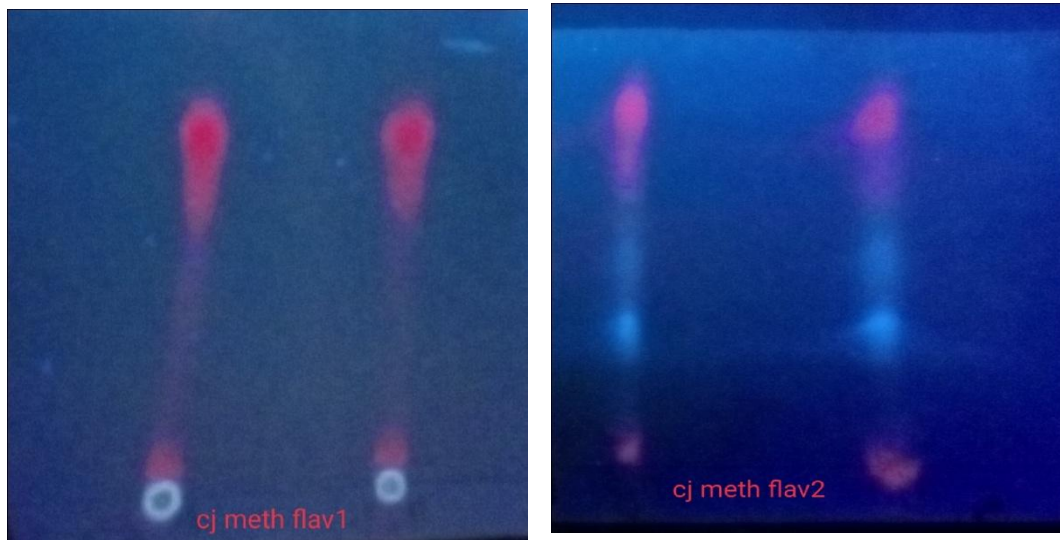


Figure17. Séparation des flavonoïdes par CCM après révélation par UV 365 (EMCJ)

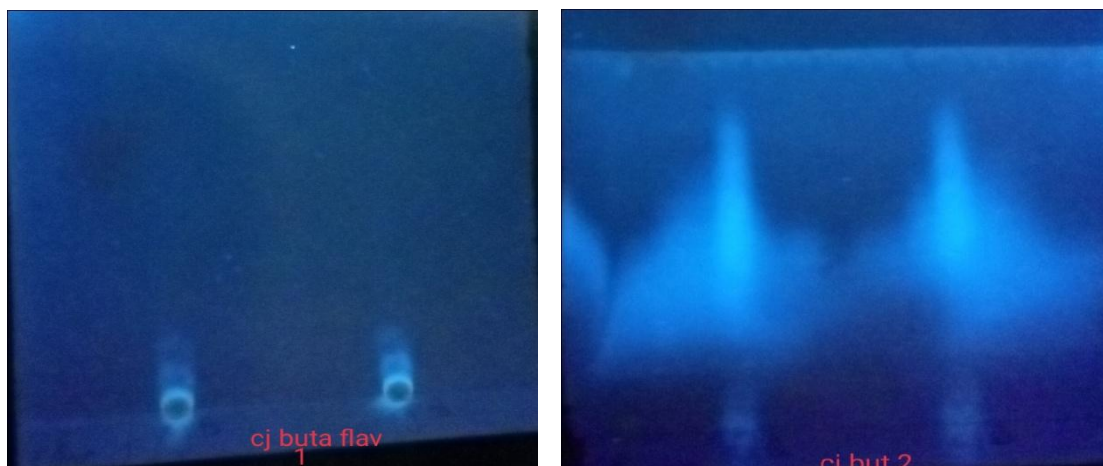


Figure18. Séparation des flavonoïdes par CCM après révélation par UV 365 (EBCJ)

II.3.2. Séparation des tanins par CCM

Pour l'identification des tanins pour l'EMCJ et l'EBCJ de la plante *C. jacea*, on utilise des plaques en aluminium recouvertes de gel de Silice comme phase stationnaire. La révélation est faite par une solution de chlorure de fer 2 % après séchage. La chromatographie est effectuée à une température ambiante et à la pression atmosphérique. (Tableau 11)

Tableau 13. Résultat de la séparation des tanins par CCM (EMCJ +EBCJ)

Extrait	Système solvant	Couleur des spots après révélation	Rf
EMCJ	toluène ,acétone , acide acétique (5V/5V/1V)	Vert	0.67
EBCJ	toluène ,acétone , acide acétique (5V/5V/1V)	Vert Marron	Rf1=6/6.5=0.92 Rf2=7/6.5=1.07 Rf =1.07-0.92=0.15

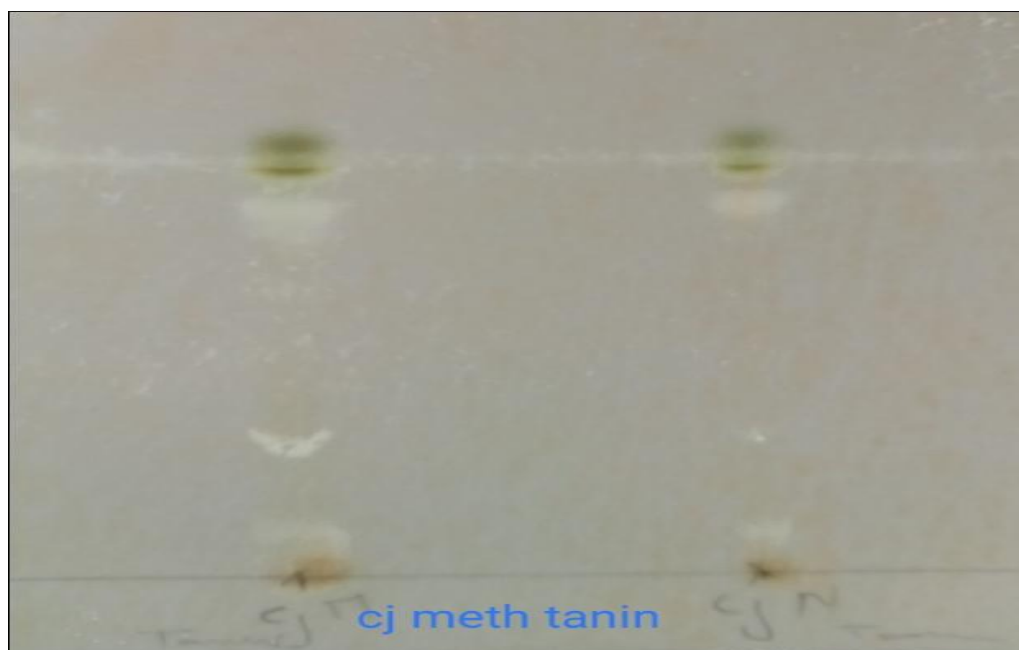


Figure19. Séparation des tanins par CCM de l'EMCJ

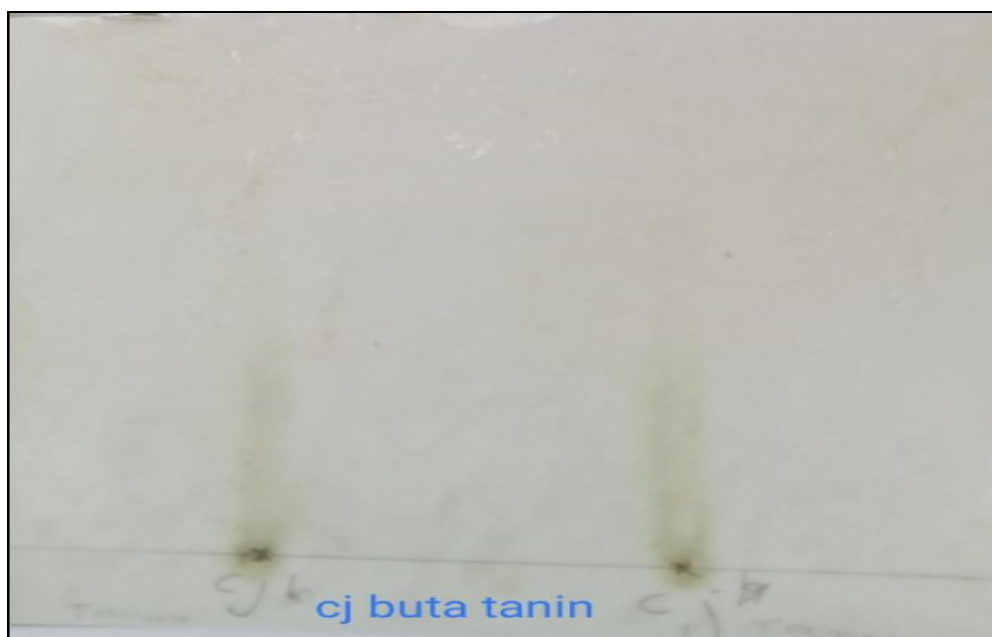


Figure20. Séparation des tanins par CCM de l'EBCJ

II.3.3.Séparation des saponosides par CCM

la révélation est faite par l'acide sulfurique 3%,(figure 11)

Tableau 14. Résultat de la séparation des saponosides par CCM (EMCJ+EBCJ)

Extrait	Système solvant	Couleur des spots après révélation	Rf
EBCJ	toluène , méthanol ,déchlorométhane 4V/5V/1V	Orange	0.875
EMCJ	toluène , méthanol ,déchlorométhane 4V/5V/1V	Vert	0.875

Après la révélation mettre les plaques dans l'étuve 110° pendant 10mn

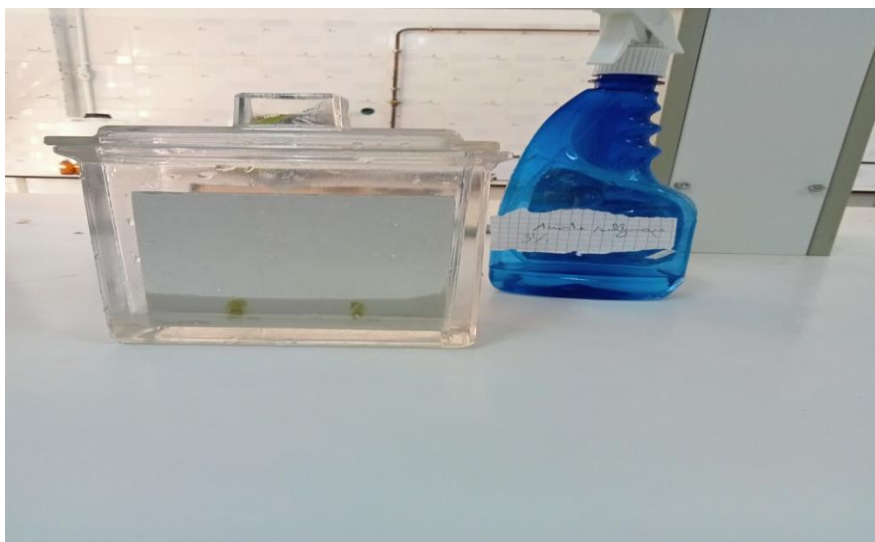


Figure 21. la séparation des saponosides par CCM



Figure 22. Séparation des saponosides par CCM de l'EMCJ



Figure 23. Séparation des saponosides par CCM de l'EBCJ

Le rapport frontal pour l'extrait méthanolique est égale le rapport frontal pour l'extrait butanolique.

Les saponosides, se retrouvent majoritairement dans les extraits d'éther de pétrole et de dichlorométhane (4 composés chacun) ; dans l'ensemble, les phytoconstitués sont plus nombreux dans les extraits de dichlorométhane, de méthanol (8 composés chacun), et d'acétate d'éthyle (7 composés).

(Mamadou Aïssa Jazy,2018)

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de notre extrait, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis. Elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de notre extrait (fluorescence, coloration et facteurs de rétention).

III. Etude de l'effet des extraits sur l'antibio-résistance :

III.1. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques.

L'antibiogramme a été réalisé selon la technique de référence de diffusion en milieu gélosé (MüllerHinton) vis-à-vis de 11 antibiotiques de plusieurs familles d'antibiotique (voir tableau ci-dessus)

Tableau 15 : Antibiotiques testés pour les souches étudiés .

Famille d'ATB	Disque d'ATB testés	Abréviations	Charges (µg)
Béta-lactamines	Aztréonam	ATM	30
	Pénicilline	P	30
	Ceftazidime	CAZ	30
	Piperacilline	PRL	100
Macrolides	Erythromycine	E	15
	Spiramycine	SP	100

Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
Aminosides	Kanamycine	K	10
Nitrofurane	Nitrofurantoïne	F	10
Polymyxines	Colistin sulfate	CT	10

Les résultats des antibiogrammes ont fait ressortir que les souches sont résistantes à certaines familles d'antibiotiques testés. (Tableau 12)

Tableau 16 : Résultats de l'antibiogramme

Familles d'ATB	ATB testés	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella. pneumoneae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Béta-lactamines	ATM	S	S	S	S	S
	P	R	R	R	R	R
	CAZ	R	R	R	R	R
	PRL	S	R	S	I	S
Macrolides	E	S	X	S	I	I
	SP	S	S	S	R	R
Tétracyclines	TE	R	S	S	S	S
Quinolones	NA	R	S	S	S	S
Aminosides	K	S	S	S	S	S
Nitrofuranes	F	S	R	S	R	R
Polymyxines	CT	X	R	X	X	X

S : sensible R : résistante I : intermédiaire X : ATB non testé

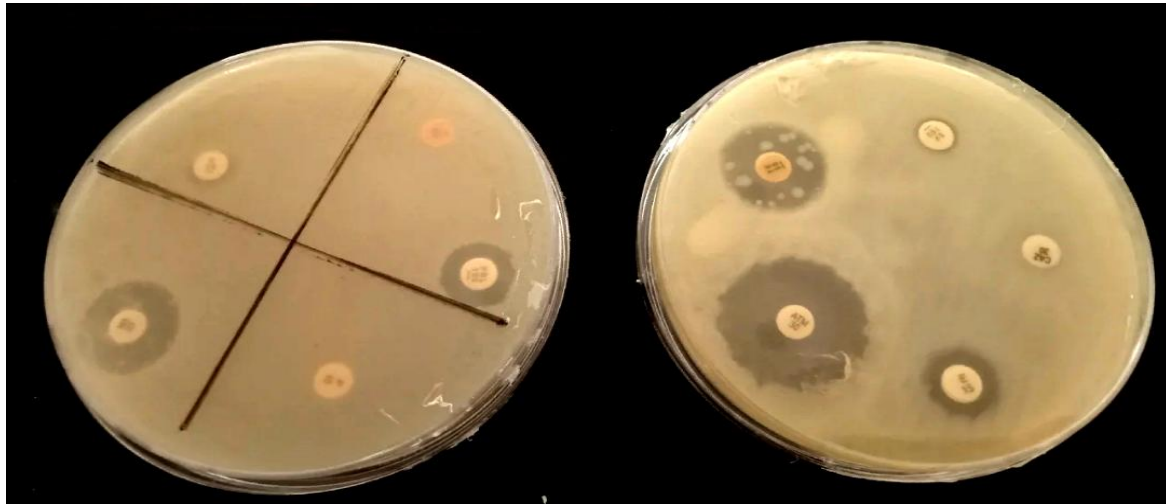


Figure 24. L'antibiogramme de *Klebsiella.pneumoniae*

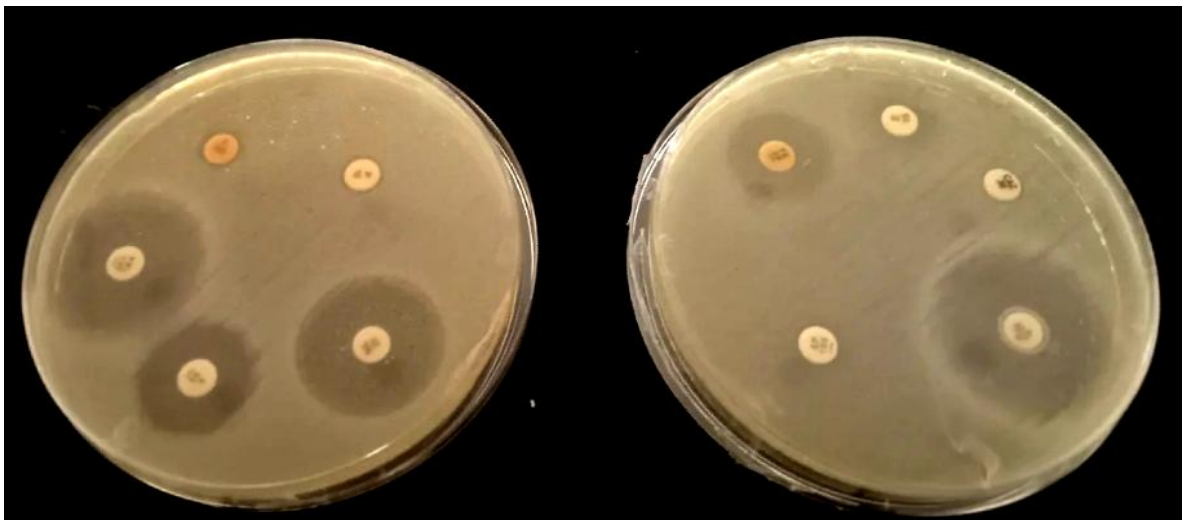


Figure 25. L'antibiogramme de *Pseudomonas.aeruginosa*

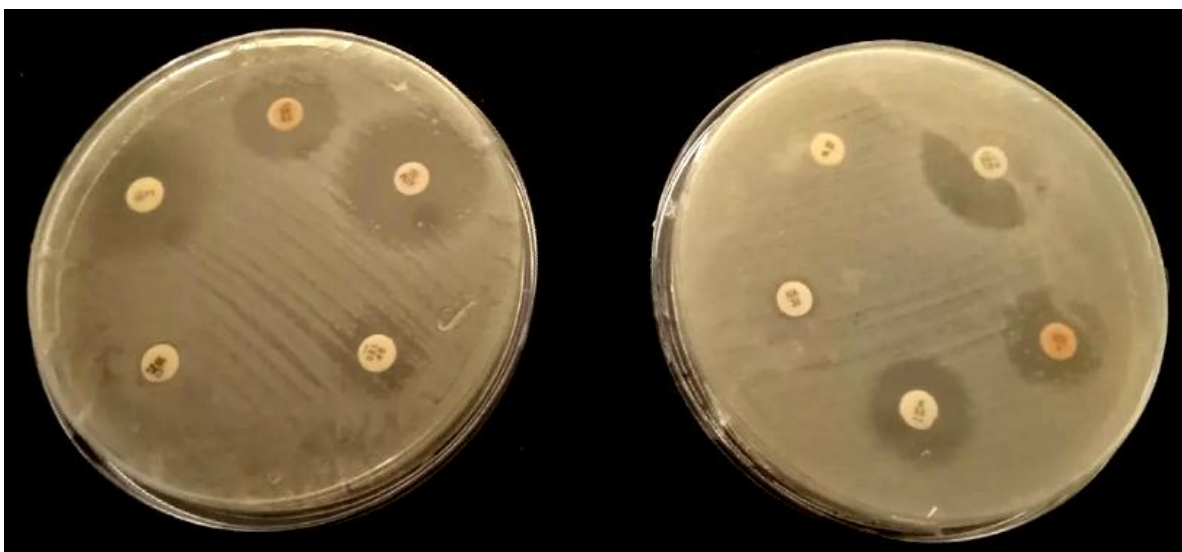


Figure 26. L'antibiogramme de *Escherichia.coli*

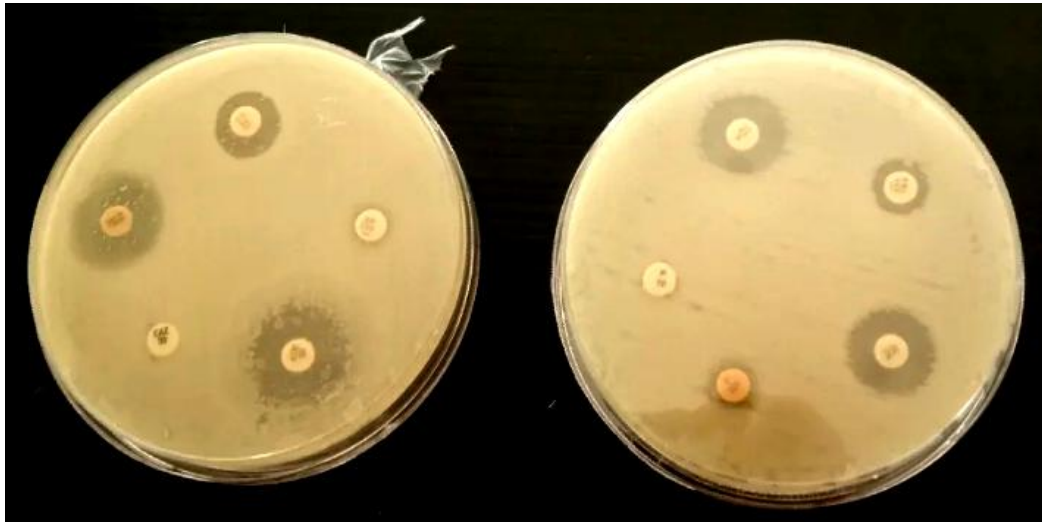


Figure 27. L'antibiogramme de *Staphylococcus.aureus*



Figure 28. L'antibiogramme de l'*Enterobacter.spp*

D'après les résultats obtenus de l'antibiogramme, on conclure que :

- *E.coli* est une bactérie multi-résistante : elle résiste à trois familles d'antibiotiques (les bêta-lactamines, les quinolones, les tétracyclines).
- *Staphylococcus.aureus* est une bactérie multi-résistante : elle résiste à trois familles d'antibiotiques (les bêta-lactamines, les nitrofuranes, les polymyxines)
- *Enterobacter* est une bactérie résistante à une seule famille d'antibiotique (les bêta-lactamines)
- *Klebsiella. pneumoniae* est une bactérie multi-résistante : elle résiste à trois familles d'antibiotiques (les bêta-lactamines, les macrolides, les nitrofuranes).
- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie multi-résistante : elle résiste à trois familles d'antibiotiques (les bêta-lactamines, les macrolides, les nitrofuranes).

L'antibiogramme est effectué pour mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques et dépister les résistances acquises ou naturelles pour une orientation des décisions thérapeutiques.

Donc on a choisis d'utiliser la Pénicilline G (un β -lactamines) dans notre objet de recherche « l'inhibition de l'antibiorésistance » parce que toutes les souches sont résistantes à cet ATB. (Les entérobactéries tels que *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter.spp* sont résistantes naturellement à la pénicilline G).

Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent le noyau bêtalactame et qui rendent l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible : les « protéines de liaison à la pénicilline » (PLP). La parenté structurale que les bêta-lactamases partagent avec les PLP leur permet de lier, acétyler et hydrolyser donc inactiver les β -lactamines. Les bêta-lactamases sont exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*) ou péri-plasmiques (bactéries à Gram négatif) (Bibbal_Delphine, 2008)

La destruction des β -lactamines par les bêta-lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries à Gram négatif par trois actions :

* **Modification des PLP** : Ces PLP modifiées présentent une affinité plus faible pour les β -lactamines. Elles sont relativement résistantes à l'inactivation par les pénicillines et sont capables de remplir les fonctions des PLP lorsque ces dernières sont inactivées. Ce mécanisme de résistance est majeur pour les bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et les entérocoques .

* **Diminution de la perméabilité de la membrane externe** : Chez les bactéries à Gram négatif, la perte ou la diminution de l'expression des porines limite l'entrée de certaines β -lactamines dans l'espace péri-plasmique et donc l'accès à la membrane interne où sont situées les PLP. Cette diminution de la perméabilité contribue au développement de résistance aux β -lactamines, d'autant plus si elle est associée à d'autres mécanismes de résistance. (Bibbal_Delphine , 2008)

* **Protéines d'efflux** : L'acquisition ou la surproduction de pompes à efflux peuvent expulser les β -lactamines hors de la bactérie même contre le gradient de concentration.

III.2. Valorisation de l'effet inhibiteur des extraits de *C. jacea* et de l'huile essentielles de *S. aromaticum* et de *Thymus.sp* contre l'antibio-résistance par la méthode des disques :

III.2.1. Etude de l'effet inhibiteur de l'antibiorésistance par l'EMCJ :

Tableau 17: Résultats de l'effet inhibiteur de l'antibiorésistance par l'EMCJ

	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterobacter.sp</i> <i>p</i>	<i>K.pneumoneae</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Disque d'ATB (P)	-	-	-	-	-
Disque P + 10µl de EMCJ	(9mm± 0)	-	-	-	-
Disque imbibé par l'extrait Cj	-	(6mm±0)	-	-	-
Disque imbibé par DMSO	-	-	-	-	-

(-) Résultats négatifs (+) Résultats positif (x) ATB non testé

Remarque : La colistine sulfate(CT) a été testé sur la souche *S.aureus* mais le résultat a été négatif sauf pour l'effet de l'EMCJ qui donne la même zone d'inhibition **(6mm±0)**

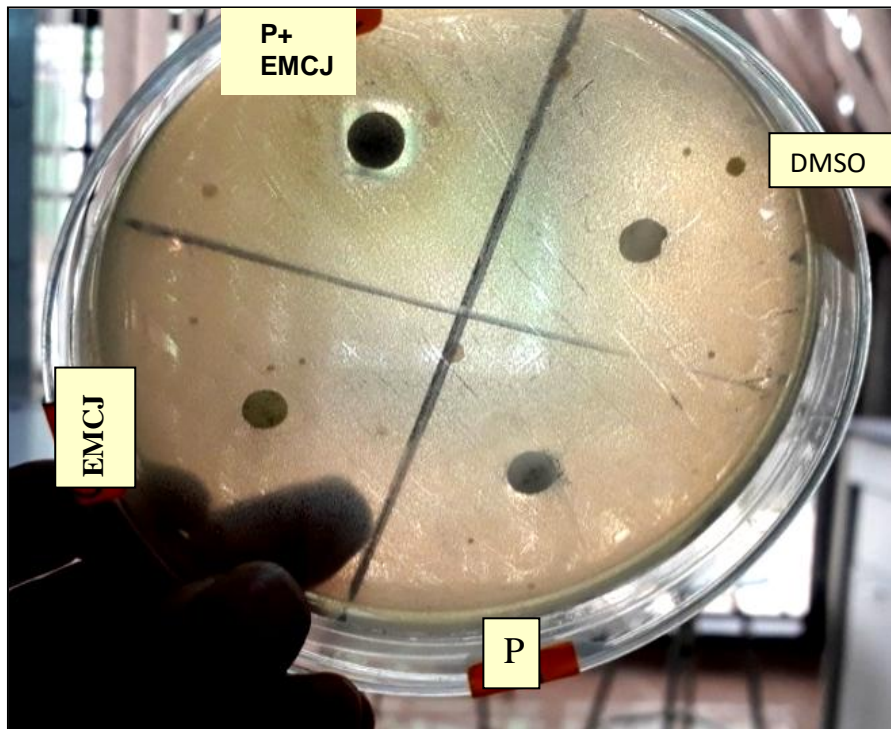


Figure 29. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *E.coli* à la pénicillineG par l'EMCJ

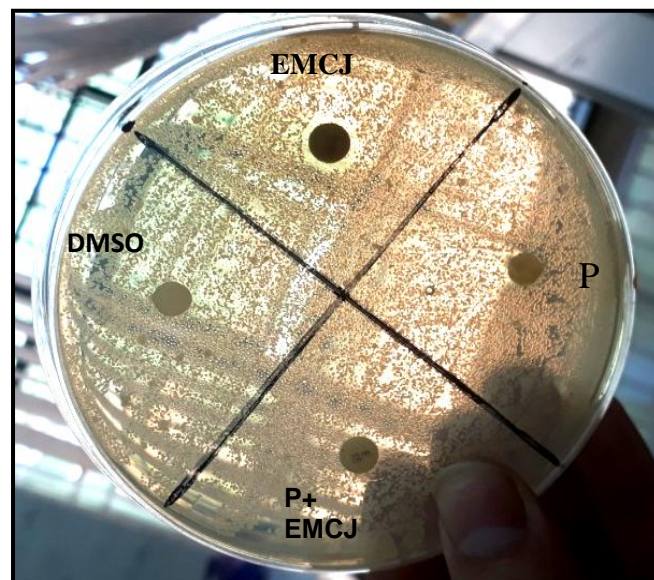


Figure 30. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance *S.aures* à la pénicillineG par l'EMCJ

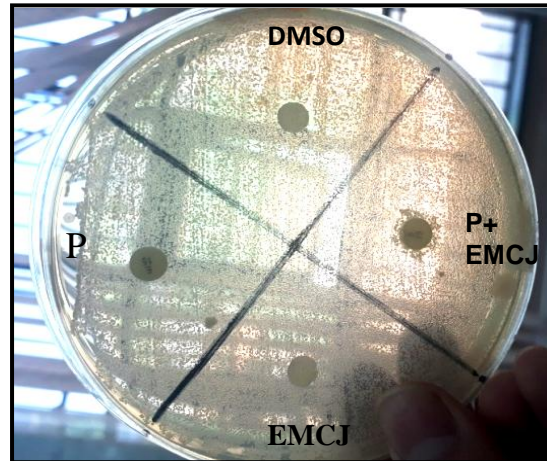


Figure31. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *P.aeruginosa* à la pénicilline G par l'EMCJ

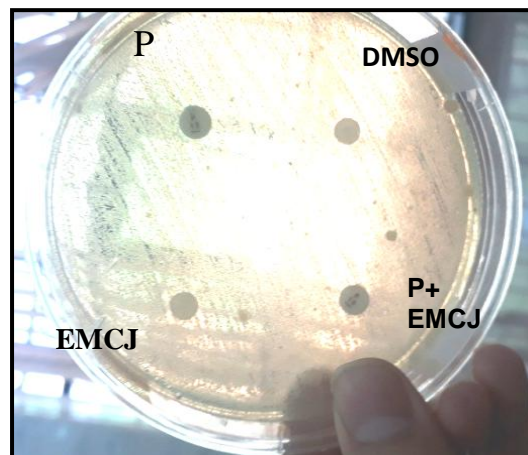


Figure32. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *Enrrobacter.spp* à la pénicilline G par l'EMCJ

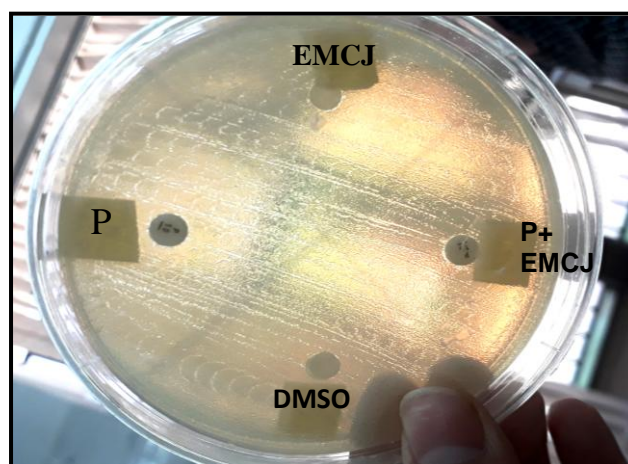


Figure33. . Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *K.pneumoniae* à la pénicilline G par l'EMCJ

Le test a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, après l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés autour de chaque disque.

D'après les résultats obtenus (le tableau et les figures) on a constaté que l'EMCJ a une activité d'inhibition de la résistance à l'antibiotique utilisé (pénicilline G) sur la bactérie *E.coli* (**9mm±0**) parce que le résultat est négatif avec l'extrait mais positif avec la combinaison de l'antibiotique avec l'extrait mais on remarque que l'extrait n'a aucune activité inhibitrice sur les autres souches (*S. aureus*, *Enterobacter.spp*, *K. pneumoneae*, *P. aeruginosa*) mais il a un effet inhibiteur de la croissance sur *S.aureus* (**6mm±0**)

A notre connaissance, la plante *C. Jacea* et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Thymus.sp* n'ont été jamais étudiées pour évaluer l'inhibition de la résistances des bactéries aux ATB.

Il s'est avéré que les substances naturelles issues des végétaux peuvent améliorer les performances des antibiotiques. Cela se fait par ; l'augmentation de l'efflux de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule et l'empêcher de sortir, l'inhibition des β -lactamases, et l'empêchement de la modification des récepteurs des antibiotiques, (Elkoll Meriem , 2016)en inhibant alors les mécanismes de résistance cité par (Bibbal_Delphine , 2008) (le mécanisme de la résistance aux β -lactamines cité dans la discussion de l'antibiogramme)

Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des (Protéine Liant la Pénicilline) PLPs (quinones, terpénoïdes) provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bétalactamases (alkyls gallates ; phénols). (**Figure 29**) (Toure Daouda , 2015)

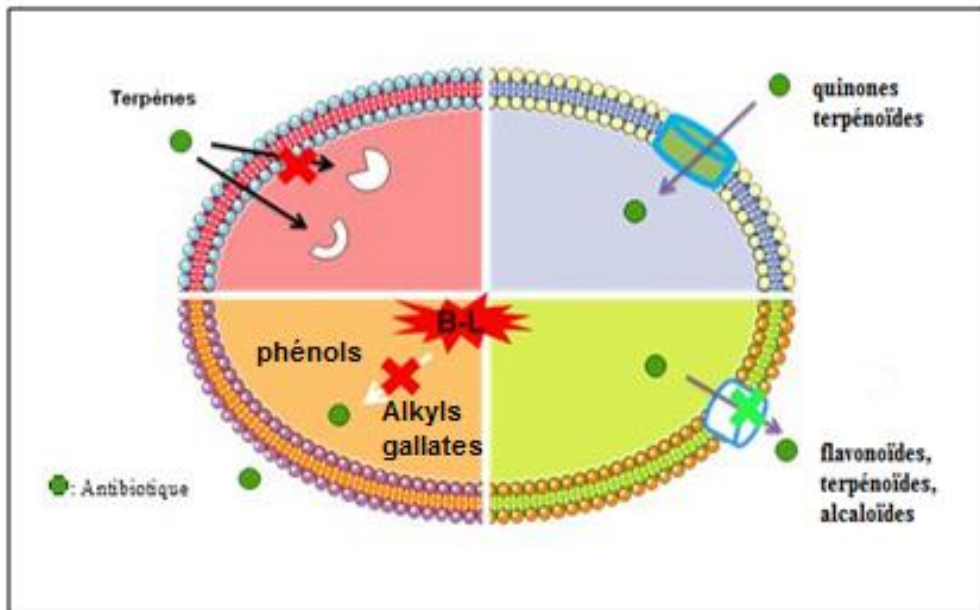


Figure34. Mécanismes d'inhibition de la résistance aux ATB par les métabolites secondaires issues des plantes médicinales (Elkolli Meriem , 2016)

E.coli est l'une des entérobactéries (Bacilles à Gram-) résistantes aux β -lactamines par production d'enzymes inactivatrices, sécrètent des β -lactamases qui se localisent dans l'espace périplasmique et nécessitent pour être libérées la cassure de la paroi bactérienne. On parle d'abord des mécanismes de résistance aux β -lactamines :

La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines (Livermore, 1995) Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines. Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram négatif (souche testé *E.coli*). (Ganpiejo , 2007)

Trois inhibiteurs de β -lactamases sont actuellement utilisés en association avec les β -lactamines pour empêcher leur dégradation par ces enzymes et sont : l'acide clavulanique, le tazobactame et le sulbactame, cependant ces inhibiteurs peuvent provoquer des effets indésirables, c'est pour cela les scientifiques ne cessent de rechercher et penchent vers les plantes médicinales riches en multiples substances phytothérapeutiques tel que les flavonoïdes, les polyphénols, les tanins et les huiles essentielles qui peuvent être l'arme permettant de faire face à l'antibio-résistance sans effets secondaires (Hamadache Noura , 2011)

Des études récentes ont démontré que les extraits naturels sont capables d'inhiber partiellement ou totalement les systèmes de résistance des souches bactériennes aux antibiotiques (Tiwari et al., 2005 ; Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009). Les inhibiteurs les

plus étudiés sont les inhibiteurs des β -lactamases et les inhibiteurs des pompes d'efflux.

De nombreux polyphénols sont capables de se fixer sur les enzymes et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques de ces dernières et même d'abolir leurs activités (Cowan, 1999; Yousfi et al., 2006). Toutefois l'inhibition de ces enzymes est attribuée à des composés de la classe des phénols (flavonoïdes et anthocyanes) présents dans ces extraits (Gangoué Piéboji, 2007). (Hamadache Noura, 2011) Alors on suggère que les polyphénols et les flavonoïdes contenus dans notre extrait méthanolique EMCJ sont à l'origine de l'inhibition de la résistance à la pénicilline par une modification des β -lactamases produites par *E.coli* ce qui permet à la pénicilline G d'exercer son action ou par l'inhibition des pompes d'efflux comme il a montré (Cattoir, 2004, Gangoué Piéboji, 2007) dans leurs travaux que : pour lutter efficacement contre l'efflux actif, il faudrait développer des associations d'antibiotiques avec des inhibiteurs atoxiques et présentant des propriétés pharmacocinétiques superposables à celles de l'antibiotique (Cattoir, 2004).

Quelques travaux de recherche se sont orientés vers les composés phénoliques des végétaux vue l'efficacité de ces métabolites secondaires sur des bactéries résistantes par efflux actif, ainsi différentes molécules inhibitrices ont été identifiées et caractérisées (Gangoué Piéboji, 2007).

III.2.2. Etude de l'effet inhibiteur de l'antibio-résistance par l'EBCJ :

Les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau18 : L'effet inhibiteur de l'antibio-résistance par l'EBCJ

	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterobacter.sp</i> <i>p</i>	<i>K.pneumonea</i> <i>e</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Disque d'ATB (PénicillineG)	-	-	-	-	-
Disque d'ATB+ 10 μ l de l'EBCJ	-	-	-	-	-
Disque imbibé par 10 μ l de l'EBCJ	-	-	-	-	-
Disque imbibé par 10 μ l de DMSO	-	-	-	-	-

(-) Résultat négatif

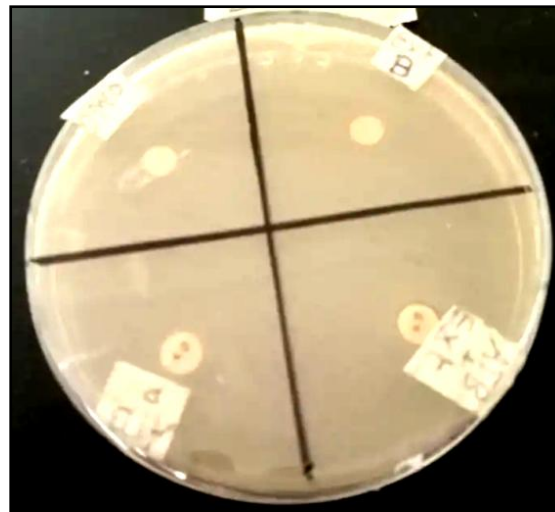


Figure 35. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *E.coli* à la pénicilline par EBCJ

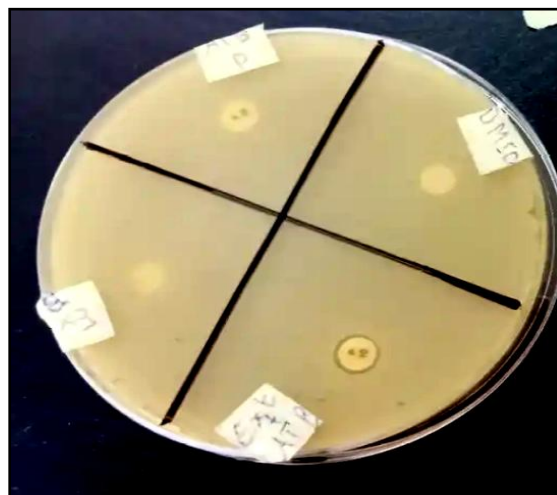


Figure 36. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *K.pneumoniae* à la pénicilline par EBCJ

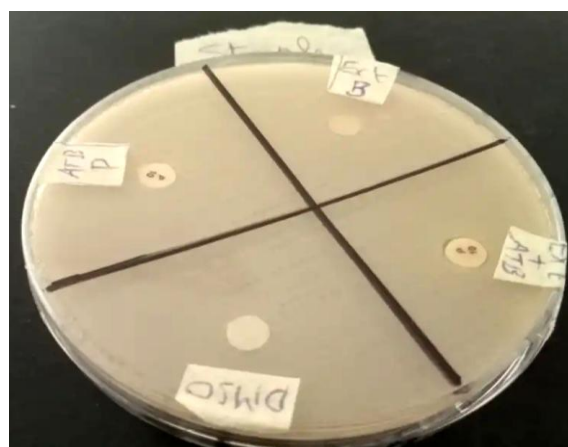


Figure 37. photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *S.aureus* à la pénicilline par l' EBCJ

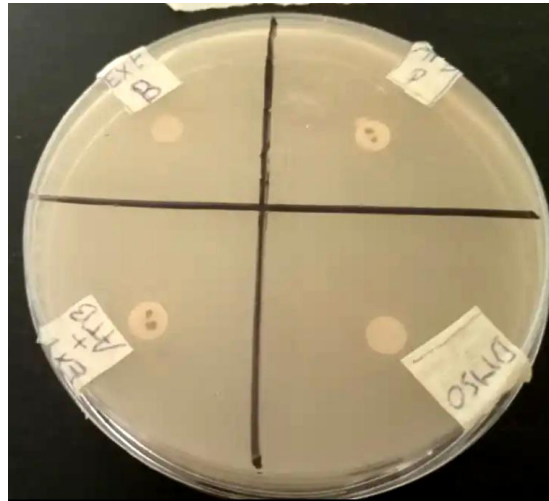


Figure 38. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance D'*Enterobacter.spp* à la pénicilline par l'EBCJ

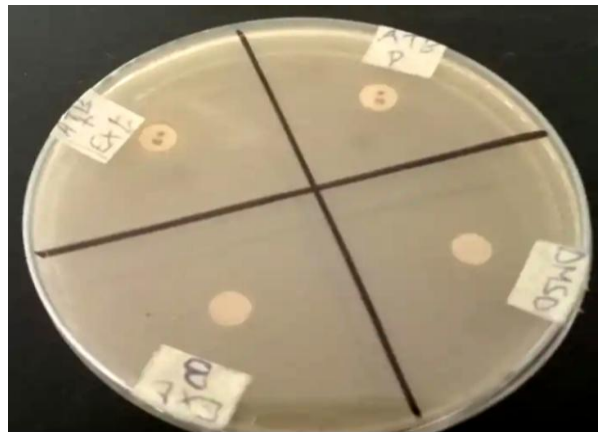


Figure 39. Photo du résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *P.aeruginosa* à la pénicilline par l'EBCJ

Tous les résultats sont négatifs ce qui explique que l'EBCJ n'a aucune activité inhibitrice de la résistance à la pénicilline sur toutes les souches bactériennes.

IV. L'effet des huiles essentielles sur l'inhibition de l'antibio-résistance

L'inhibition de la résistance des antibiotiques par les huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du criblage ont été présentés dans le tableau et les photos ci-dessous (en prenant la moyenne des diamètres des zones d'inhibition par **mm** dans les deux répétitions) :

Tableau19 : Effets inhibiteurs des HE1 et HE2 sur l'antibiorésistance

	ATBp	HE1	HE2	HE1+ATBp	HE2+ATBp
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	(13mm±0)	-	++ (17mm±0)
<i>Enterobacter.Spp</i>	-	-	(13mm±0)	-	+ (13mm±0)
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	(12mm±0)	-	+ (12mm±0)
<i>S.aureus</i>	-	+ (13mm±0)	+++ (35mm±0)	+ (13mm±0)	+++ (45mm±0)

Les résultats sont interprétés comme suit : (-) Bactérie résistante, + Bactérie sensible, ++ Bactérie très sensible, +++ Bactérie à sensibilité très élevée.

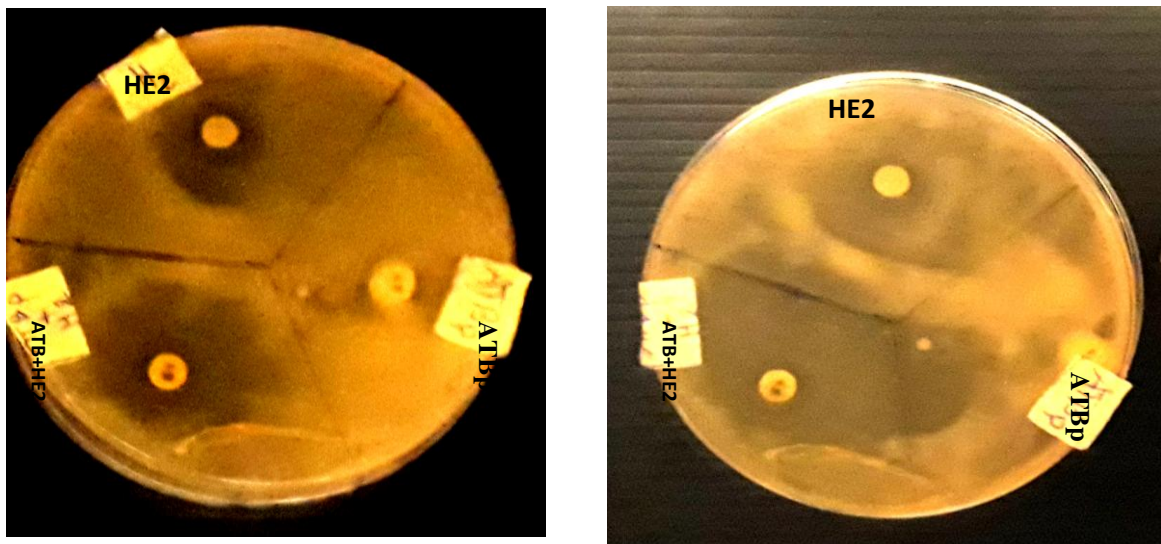


Figure 40. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *S.aureus* à la pénicilline par HE2 (à gauche après 24 heures d'incubation et à droite après 48 heures d'incubation)

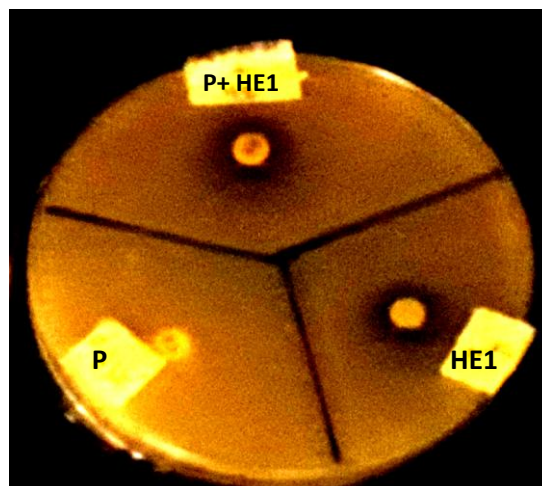


Figure 41. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *S.aureus* à la pénicilline par HE1

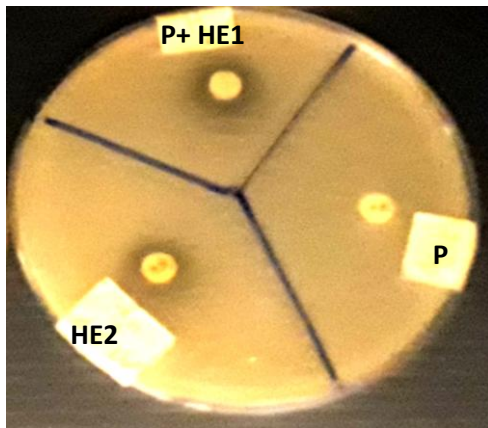


Figure 42. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *E.coli* à la pénicilline par HE2

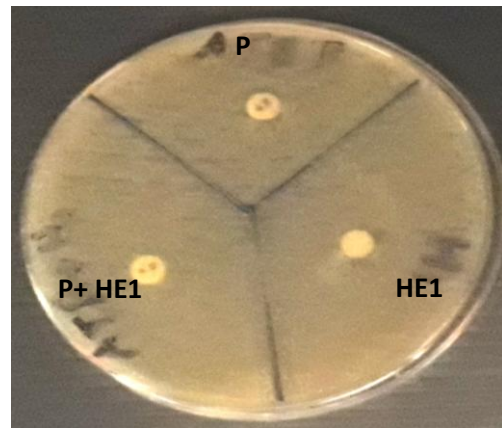


Figure 43. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *E.coli* à la pénicilline par HE1

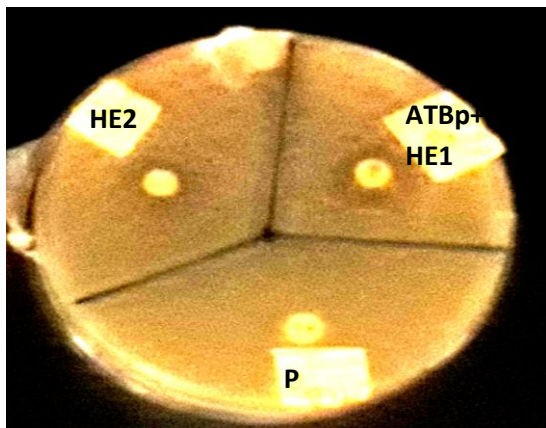


Figure 44. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *Enterobacter.spp* à la pénicilline par HE2

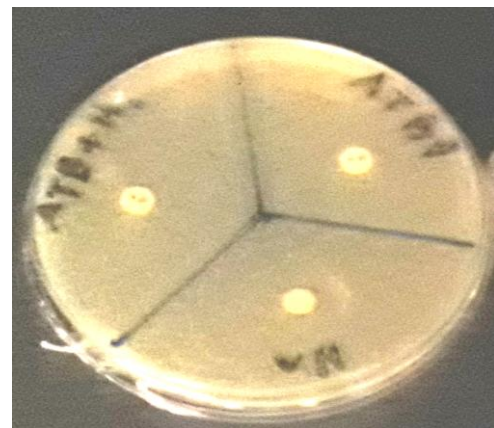


Figure 45. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *Enterobacter.spp* à la pénicilline par HE1

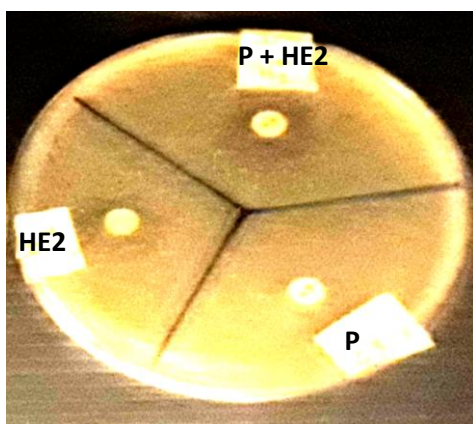


Figure 46. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *K.pneumoniae* à la pénicilline par HE2

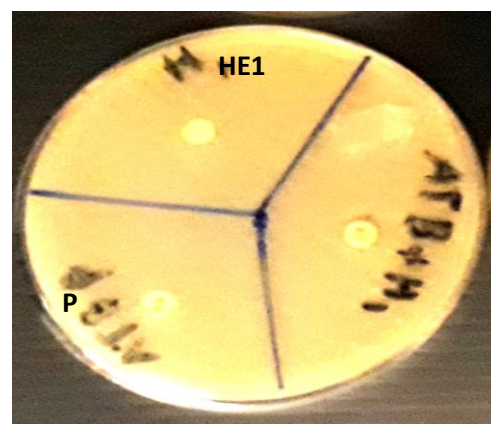


Figure 47. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *K.pneumoniae* à la pénicilline par HE1

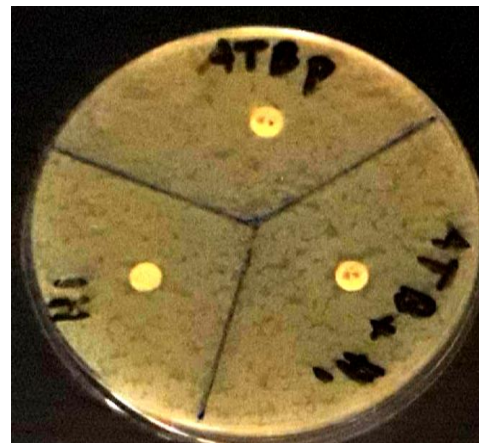
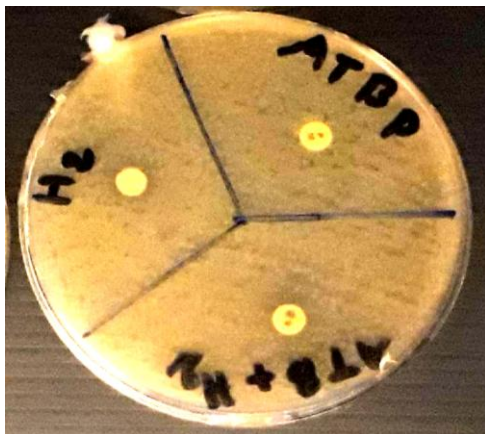


Figure 48. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *P.aeruginosa* à la pénicilline par HE2

Figure 49. Résultat de l'effet inhibiteur de la résistance de *P.aeruginosa* à la pénicilline par HE1

D'après le tableau et les photos, les résultats ont été interprétés comme suit :

- Pour *S.aureus* (Gram+) et *E.coli* (Gram-) le diamètre d'inhibition (zone d'inhibition) par l'association de l'HE2 de (*Syzygium aromaticum*) avec l'antibiotique (pénicilline G) est plus grand que la zone d'inhibition de HE2 seule, alors on suggère qu'il y a une activité remarquable d'inhibition de la résistance à la pénicilline G par cette huile essentielle.

D'après les travaux antérieurs sur l'effet inhibiteur de l'antibio-résistance des HE (Lambert *et al.*, 2001) ont montré que le carvacrol et le thymol des huiles essentielles semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire en détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives (Helander *et al.*, 1998) (c'est le cas d'*E.coli* dans notre étude pour HE2 de *Syzygium aromaticum*), elles augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires et par conséquent elles peuvent être également augmenter la perméabilité des ATB pour faciliter l'action de l'ATB sur les bactéries et alors réverser la résistance. Les HE pénètrent dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. (Elodie Guinoiseau 2010)

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité, ce qui permet leur solubilisation dans les membranes et provoquer une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994), ce qui explique la perméabilité de la membrane des *S.aureus* et alors la diffusion

de l'ATB pour exercer son activité, en inhibant alors la résistance de la bactérie à la pénicilline.

- Pour *K.pneumoniae* et *Enterobacter.spp* (Gram-) le diamètre d'inhibition (zone d'inhibition) par l'association de l'HE2 de (*Syzygium aromaticum*) avec l'antibiotique (pénicilline G) est égal à celle de l'huile, alors on peut conclure qu'il y a une activité antibactérienne de l'huile (inhibition de la croissance) sur les souches et c'est le même cas pour *S.aureus* avec l'HE1 de (*Thymus sp*)

Le mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles n'est pas bien élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles essentielles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires..(Bibbal_Delphine , 2008) Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont Les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures.

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). Comme il a montré (Burt, 2004) les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004) ; on a confirmé que l'HE2 de (*Syzygium aromaticum*) a une activité très importante sur cette bactérie *S.aureus*(Gram+), et comme il a montré (Dorman et Deans, 2000) la bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa*, on a trouvé que HE1 et HE2 n'ont pas aucune activité sur cette souche.

Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *S. aureus* (Shin et Kim, 2005) comme on a obtenu dans notre recherche (L'effet de HE1 sur *S.aureus*)

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. L'huile de *Thymus.sp* se révèle particulièrement

efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (Elodie Guinoiseau 2010) ce qui explique l'effet de l'HE1 de *Thymus.sp* sur *S.aureus* dans notre recherche .

Conclusion et perspectives

L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie, de même la résistance bactérienne aux ATB qui constitue un problème majeur dans le monde entier. Pour cela on a étudié l'effet inhibiteur de la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques par les extraits méthanolique et butanolique de la plante *C.jacea* et des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Thymus.sp.*

Le screening phytochimique et le CCM sur l'EMCJ et l'EBCJ ont montré que *C.jacea* est riche en substances naturelles très variées tels que les flavonoïdes, les tannins et les saponines, les alcaloïdes les sucres réducteurs, les polyphénols, les caroténoïdes. Ainsi que l'analyse spectrale de l'EMCJ et l'EBCJ a montré que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes qui sont à l'origine d'une activité inhibitrice très intéressante de la résistance des souches *E.coli* et *S.aureus* à la pénicilline G, cette activité a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé qui donne aussi un résultat remarquable d'inhibition de l'antibiorésistance par l'HE de *Syzygium aromaticum* sur la souche *S. aureus*.

Ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques. Sachant que la plante *C.jacea* et l'HE de *Syzygium aromaticum* se caractérisent par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des effets importantes d'inhibition de la résistance des bactéries aux ATBs, il est donc nécessaire de :

- Procéder à une enquête plus approfondie en ce qui concerne le fractionnement et la purification de composés bioactifs ainsi que leur mode d'action sur les cellules microbiennes, et encore une recherche plus avancée de l'effet de l'association ATB et substances naturelles issus de ces plantes.
- Ainsi, la combinaison de ces deux stratégies thérapeutiques (Antibiotiques + substances actives des plantes) devrait contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre le problème récurrent de l'antibio-résistance bactérienne.
- Toutefois, d'autres études seront nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des composés actifs responsables de cette activité d'inhibition de l'antibiorésistance et l'identification de leur mécanisme d'action *in vivo*.
- Enfin , une recherche d'autres activités des extraits de ces plantes est nécessaire.

Résumé

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet inhibiteur de la plante médicinale *Centaurea jacea* et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Thymus.sp* sur la résistance ou la multi-résistance (MDR) des bactéries pathogènes aux antibiotiques.

Le screening phytochimique sur l'EMCJ et l'EBCJ a révélé que cette plante contient : des alcaloïdes, des saponosides, des tanins totaux et galliques, des sucres réducteurs, des flavonoïdes, des polyphénols et des caroténoïdes.

L'étude quantitative a montré que l'EBCJ représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (24.84 mgEQ/gE) en comparaison avec l'EMCJ (21.8 mgEQ/gE), également le dosage a prouvé que l'EBCJ est le plus riche en polyphénols (413 mg EQ/g d'extrait) par rapport à l'EMCJ (65.47 mg EQ/g d'extrait). Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM de l'EMCJ et l'EBCJ a confirmé la richesse de ces deux extraits en tanins, saponosides et flavonoïdes.

Pour l'activité de l'inhibition de la résistance, un test a été effectué sur cinq souches quatre Gram- (*E.coli*, *Pseudomonas.aeruginosa*, *Enterobacter.sp* et *Klebsiella.pneumoniae*) et une Gram+ *Staphylococcus.aureus* en adoptant la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats obtenus avec l'EBCJ et l'huile essentielle de *Thymus.sp* sont tous négatifs. Alors que l'EMCJ montre un effet inhibiteur de l'antibio-résistance à la pénicilline G (9mm) sur *E.coli*, et même pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui donne un effet très important sur *S.aureus* (45 mm) et sur *E.coli* (17mm).

Cependant les résultats obtenus révèlent que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a une activité antibactérienne sur *Enterobacter.sp* (13mm) et *K.pneumoniae* (12mm), tandis que l'huile essentielle de *Thymus.sp* montre une activité antibactérienne sur seulement *S.aureus* (13mm).

La présente étude suggère que l'EMCJ et l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* peuvent atténuer la résistance d'*E.coli* à la pénicilline G. Ainsi que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* peut reverser d'une manière importante la résistance de *S.aureus* à la pénicilline G. Donc, les deux plantes (*Centaurea Jacea* et *Syzygium aromaticum*) peuvent être une source prometteuse de nouvelles substances inhibitrices de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Mots clés : Résistance bactérienne, polythérapie, antibiotiques, *Centaurea jacea*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus.sp*, métabolites secondaires, EMCJ, EBCJ

Abstract

The main objective of this study is to evaluate the inhibitory effect of the medicinal plant *Centaurea jacea* and the essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Thymus.sp* on the resistance or multidrugresistance (MDR.) of pathogenic bacteria to antibiotics.

Phytochemical screening of the methanolic extract of *Centaurea jacea* (MECJ) and the butanolic extract of *Centaurea jacea* (BECJ) revealed that the plant contains: alkaloids, saponosides, total and metallic tannins, reducing sugars, flavonoids, polyphenols and carotenoids.

The quantitative study showed that BECJ was the highest flavonoid content (24.84 mgEQ/gE) compared to MECJ (21.8 mgEQ/gE), and the assay also showed that BECJ was the richest in polyphenols (413 mg EQ/g extract) compared to the MECJ (65.47 mg EQ/g extract). Qualitatively, Thin Layer Chromatography (TLC) analysis of the MECJ and the BECJ confirmed the richness of these two extracts in tannins, saponosides and flavonoids.

For the resistance inhibition activity, test was performed on five bacteria four Gram- (*E.coli*, *Pseudomonas.aeruginosa*, *Enterobacter.sp*, and *Klebsiella.pneumoniae*) and one Gram+ (*Staphylococcus.aureus*) using the agar diffusion method. The results obtained with BECJ and essential oil of *Thymus.sp* are all negative. When the MECJ showed an inhibitory effect of antibio-resistance to penicillin G (9mm) on *E.coli*, and also for the essential oil of *Syzygium aromaticum* which revealed a very important effect on *S.aureus* (45 mm) and *E.coli* (17mm).

However, the results showed that the essential oil of *Syzygium aromaticum* had antibacterial activity on *Enterobacter.sp* (13mm) and *K.pneumoniae* (12mm), while the essential oil of *Thymus.sp* showed antibacterial activity on only *S.aureus* (13mm).

This study suggests that MECJ and essential oil of *Syzygium aromaticum* can reduce the resistance of *E. coli* to penicillin G. As well as the essential oil of *Syzygium aromaticum* can significantly reverse *S. aureus* resistance to penicillin G. Therefore, both plants (*Centaurea Jacea* and *Syzygium aromaticum*) can be a promising source of new inhibitory substances of bacterial resistance to antibiotics.

Keywords: Bacterial resistance, polytherapy, antibiotics, *Centaurea jacea*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus.sp*, secondary metabolites, MECJ, BECJ

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المثبط للنبتة الطبية *Centaurea jacea* والزيوت الأساسية لنببتين *Syzygium aromaticum* و *Thymus.sp* على المقاومة أو المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للبكتيريا المسببة للأمراض

كشف الفحص الكيميائي النباتي لكل من المستخلص الميثانولي و البيتانولي للنبتة الطبية *Centaurea jacea* أن هذا النبات يحتوي على القلويدات والسابونوسيدات والتانينات ، السكريات المرجعة والفلافونويدات و متعدد الفينولات اضافة إلى الكاروتينويدات.

أظهرت الدراسة الكمية احتواء المستخلص البيتانولي علي اعلي كمية من الفلافونويدات (24.84 مغ ما يعادل الكرسيتين لكل غ مستخلص) مقارنة مع المستخلص البيتانولي (21.8 مغ ما يعادل الكرسيتين لكل غ مستخلص) كما المستخلص البيتانولي يحتوي علي اعلي كمية من متعدد الفينولات (413 مغ ما يعادل حمض القاليك لكل غ مستخلص) مقارنة مع المستخلص الميثانولي (65.47 مغ ما يعادل حمض القاليك لكل غ مستخلص). ومن الناحية النوعية ، كما أكد التحليل الذي أجري بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لكل من المستخلص الميثانولي و البيتانولي للنبتة الطبية *Centaurea jacea* ثراء هذين المستخلصين من حيث التانينات والسابونوسيدات والفلافونويدات.

أما بالنسبة لنشاط كبح مفاومة البكتيريا للمضادات الحيوية ، أجري اختبار على خمس سلالات أربعة منها سالبة الغرام (*E.coli, Pseudomonas.aeruginosa, Enterobacter.sp* و *Klebsiella.ppnemoniae*) و واحدة موجبة الغرام *Staphylococcus.aureus* باستخدام طريقة انتشار الأغار كوسط للزراعة. النتائج مع المستخلص البيتانولي و *Thymus.sp* كلها سلبية. في حين يظهر المستخلص الميثانولي تأثيراً مثبطاً لمقاومة بكتيريا *E.coli* للمضاد الحيوي البنسلين G (9ملم) ، بل وحتى للزيت الأساسي *Syzygium aromaticum*، والذي يعطي تأثيراً بالغ الأهمية على *S.aureus* (45 ملم) و *E.coli* (17 ملم)

من ناحية أخرى بينت النتائج أن الزيت الأساسي للنبتة *Syzygium aromaticum* أظهر نشاط مضاد لنمو كل من بكتيريا *Enterobacter.spp* و *K.pneumoniae* ، أما الزيت الأساسي للنبتة *Thymus.sp* فقد كان له نشاط مضاد لنمو نوع واحد من البكتيريا و المتمثلة في *S.aureus* .

كما تبين هذه الدراسة أن كل من المستخلص الميثانولي لـ *C.jacea* و الزيت الأساسي لـ *Syzygium aromaticum* باستطاعتهاما تخفيض مقاومة *E.coli* للمضاد الحيوي البنيسيلين ج ، بالإضافة إلى ذلك فإن هذا الزيت الأساسي يمكن أن يعمل إلى حد كبير على تثبيط مقاومة *S.aurus* للبنيسيلين ج.

أثبتت نتائج هذه الدراسة على أنه يمكن اعتبار كل من النبتتين *C.jacea* و *Syzygium aromaticum* مصدرا واعداء لجزيئات جديدة تحول دون مقاومة البكتيريا الممرضة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: المقاومة البكتيرية ، العلاج المتعدد ، المضادات الحيوية ، *Centauria jacea* ، *Syzygium aromaticum* ، *Thymus.sp* ، جزيئات الأيض الثانوي، المستخلص الميثانولي، المستخلص البيتانولي

Annexe1

Extraction de l'huile essentielle

Pour extraire l'huile essentielle de *Thymus sp* en titre d'exemple , la technique d'hydrodistillation simple a été utilisé, celle-ci se produit dans l'appareil de Clevenger et consiste à porter à ébullition l'eau à laquelle est mélangée la poudre dans un ballon de laboratoire, et ce, grâce à un chauffe ballon. Les vapeurs hétérogènes ascendantes provenant du ballon progressent dans la partie A puis se condensent sur la surface froide du réfrigérant (partie B). Le condensat est récupéré dans la partie C ou l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse grâce à leurs différences de densité.

L'eau en excès retourne dans le ballon par la partie D qu'un robinet à 3 voies (f) fait communiquer avec la partie C. (Figure13)

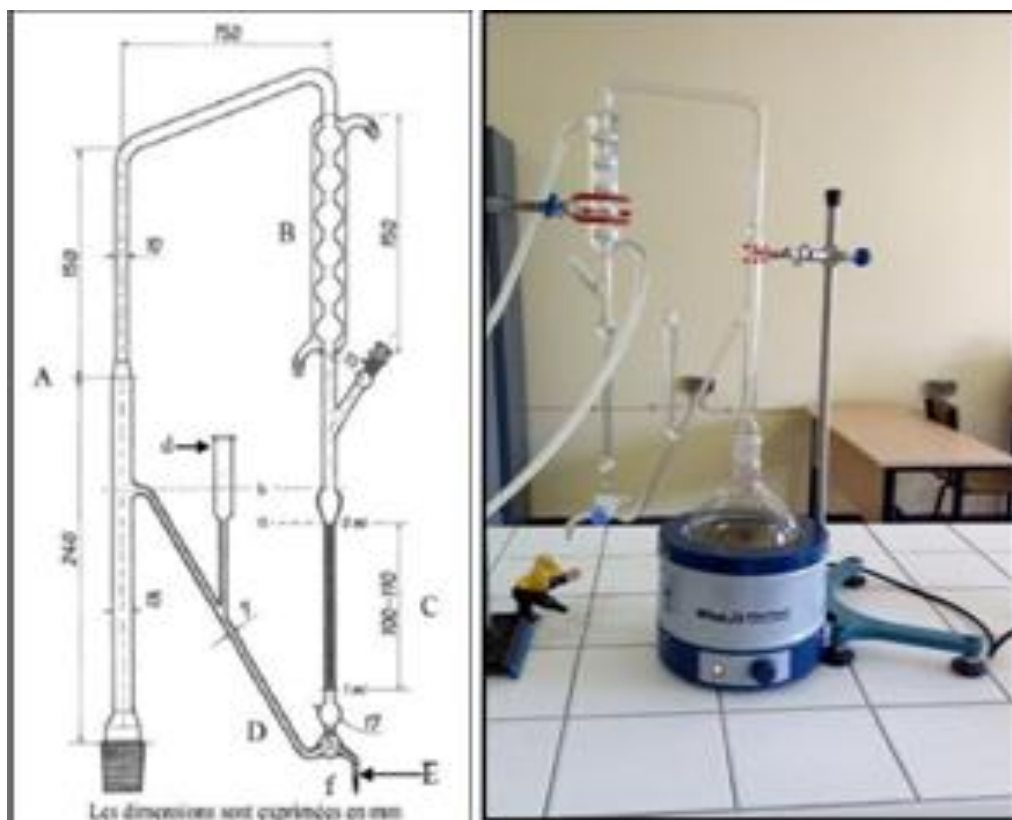


Figure 13 : le Clevenger (hydrodistillateur standardisé)

Afin de réaliser cette extraction, les étapes suivantes ont préalablement été réalisées :

1) Peser 50 grammes de la poudre du *Thymus sp*, les mélanger à 500 ml d'eau contenue

dans un ballon de laboratoire d'un litre de volume.

2) Placer ce ballon dans le chauffe-ballon et introduire l'ouverture du Clevenger dans celle du ballon.

3) Etablir un équilibre entre les volumes d'eau présents dans les parties basses du Clevenger (C, D et d) en introduisant de l'eau par l'ouverture « d » jusqu'à atteindre le niveau « b ».

4) Allumer la chauffe ballon.

Après deux heures et demie d'extraction, les deux phases (eau florale et huile essentielle) présentes dans la partie C et la partie E sont séparées en tournant le robinet à 3 voies. L'huile essentielle a été déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer

les traces d'eau avant d'être conservée dans un flacon en verre hermétique et ombré à température ambiante.



Figure 14: étapes préalables à l'extraction (les numéros correspondent aux étapes suscités) :

(Hessas Thafsouth , Simoud Sounia , 2018)

Annexe 2

Le Mac Farland

1. Qu'est-ce que les normes McFarland ?

Les étalons McFarland sont utilisés comme référence afin d'ajuster la turbidité de la suspension liquide/bactérienne dans le flacon ou le tube dans le laboratoire de microbiologie. Il aide à maintenir et/ou à garantir que le nombre de bactéries se situera dans une plage donnée pour standardiser les tests microbiens. L'étalon McFarland peut être préparé avec une concentration variable allant de 0,5 à 4 concentration et en fonction de la concentration, la densité de comptage cellulaire varie. Cependant, la concentration la plus couramment utilisée pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens et les tests de performance des milieux de culture est généralement effectuée par 0,5 McFarland standard dans les laboratoires de microbiologie.

2. Principe des normes McFarland

Un étalon McFarland est une solution chimique de chlorure de baryum et d'acide sulfurique. La réaction chimique entre ces deux produits chimiques entraîne la production d'un fin précipité de sulfate de baryum. Après avoir bien agité, la turbidité d'un étalon McFarland est visuellement comparable à une suspension bactérienne de concentration connue. Les étalons de turbidité McFarland sont préparés en mélangeant divers volumes d'acide sulfurique à 1 % et de chlorure de baryum à 1 % pour obtenir des solutions avec des densités optiques spécifiques. L'étalon de turbidité McFarland 0,5 fournit une densité optique comparable à la densité d'une suspension bactérienne avec 1×10^8 unités formant colonie (CFU/ml).

3. Préparation et utilisation du McFarland

- Préparer une solution à 1% de chlorure de baryum (BaCl_2) et une solution à 1% d'acide sulfurique(H_2SO_4)
- Pour préparer la solution de densité standard McFarland 0.5, mélanger 0.05ml de chlorure de baryum (BaCl_2 à 1%) avec 9.95ml d'acide sulfurique(H_2SO_4 à 1%)

- Conserver la préparation dans un tube à bouchon à vis à température ambiante(25°) en recouvrant de papier d'aluminium, lorsqu'il n'est pas utilisé.
- Cette solution précipitera et s'agglomérera avec le temps, alors pour une nouvelle utilisation ; elle nécessite une agitation vigoureuse(vortex).
- En présence d'un bon éclairage, comparer visuellement la turbidité avec le tube contenant l'inoculum bactérien. (Sagar Aryal.2020)
- Mais c'est mieux de mesurer l'absorbance du macFarland et des suspensions bactériennes à l'aide d'un spectrophotomètre (à une longueur d'onde de 600nm) qui doivent se situer entre 0.08 à 0.1 pour obtenir une Densité cellulaire approximative de $(1 \times 10^8 \text{ UFCs/mL})$

Annexe 3

Préparation de HCL(2N)

2N=2M=2 mole/l donc on va préparer 2 mole/l de HCL

On sait que : $d = m/V$ et $d = 1.18$ alors $m = d * v$ alors $m = 1.18 * 1000 = 1180 \text{ g} \implies m = 1180 \text{ g}$

m : masse de HCL

d : densité de HCL dans un volume **V** de 1000ml d'une solution de HCL (les chiffres sont mentionnés sur la bouteille du produit de HCL)

chaque 100 g du produit de HCL contient 37 g de HCL alors

$$100 \text{ g} \implies 37 \text{ g} \quad \implies \quad X = 1180 * 37 / 100$$

$$1180 \text{ g} \implies X \quad \implies \quad X = 436.6 \text{ g de HCL}$$

On sait que $n = m/M \implies n = 436.6 / 36.46 = 11.97$ alors $[\text{HCL}] = 11.97 \text{ mole/l}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \implies 11.97 \times V_1 = 2 \times 100 \text{ ml} \implies V_1 = 3.31 \text{ ml}$$

Donc on prend 3.31ml d »HCL et on complète à 100 ml par l'eau distillée.

Références bibliographiques

- **Abdelkader Helali** ,Centre national de pharmacovigilance et de matériovigilance
- **Adouane Selma,2016**, Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la region méridionale des aurés, Mémoire de magistère en sciences agronomiques , 239 P.
- **Akroum S, 2011**, Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels, Thèse de Doctorat en sciences en physio- toxicologie. Université Mentouri de Constantine,P :6-23.
- **Allison Muller,2017**, Bon usage des antibiotiques : résultats d’actions dans différents types d’établissements de santé , Thèse de doctorat , Université Bourgogne Franche-Comté, 192 P.
- **Anais Veyssiere ,2019** , La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019 , Thèse de docteur en pharmacie , Université Bordeaux ,105 P.
- **Attou A., 2011**, Contribution à l’étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d’Ain Témouchent, mémoire de magister en biologie, l’université de Abou Beker Belkaid Tlemcen, 11 P.
- **Audrey Beaugendre ,2013**, Les Allergies à la Pénicilline chez la femme enceinte, Thèse de docteur en medicine, Université lille , 86 P.
- Azzouzi Djihane ,2017**, Renoprotective Effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Leaves on Cisplatin -induced Oxidative Stress and Renal dysfunction in Mice, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol: 7 ,P: 147-154.
- **Barkat El houaria Belbey Meriemet Al,2017**, Etude phytochimique de deux plantes endémique (ouest algérien) *Centaurea nigra* -*Lepidium sativum* ,Mémoire de Master en Pharmacognosie et Phytothérapies, 84 P.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T. C ,1966**. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *American Journal of Clinical Pathology*. 45, P :493 - 496.
- **Benmahdi A, 2001**, Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie* , P: 2- 11.
- **Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD 2005**, Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem*, 82, P 390-393.

- **Bibbal_Delphine** , **2008** ,Impact des beta lactamines sur l'émergence d'entérobacteries résistantes dans la flore digestive, Thèse de doctorat , Université Toulouse ,152 P.
- Blog de l'Association Nature Alsace Bossue ANAB, 2019
- **Boharun T., Gressier B., Trotin F., et Al, 1996** ,Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res, P* :1-6.
- **Bruneton J, 1999**, Pharmacognosie, Photochimie Des Plantes Médicinales, 3éme Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 366 P .
- **C.T.P.Tim and J.L.Andrew,2005**, Antimicrobial activity of flavonoids, *Int. J. Antimicrob* ,P343–356.
- **Cattoir, 2004**, Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries , Vol ; 52, P : 607-616
- **Cowan M, 1999**, Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol ;12 ,P :564-582.
- **D.YALA , A, S MERAD et al, 2001** , Classification et mode d'action des antibiotiques , 8P.
- **Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO , 2005**, *Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plant* , 2016 , COURS : Structure et activites des substances naturelles , Université Ferhat Abbas de Sétif , 70 P .
- Fellah S, Romdhane M, Abderraba M ,2006**, *J. société algérienne de Chimie*, P 193.
- Françoise Van Bambeke, Sc. Pharm. Paul Tulkens, Méd.2007** , Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse 1. Antibiotiques 2. Antifongiques, 202 P.
- **Jacques Buxeraud, 2016**,„Les aminosides ou aminoglycosides , Vol 55 - N° 558S
- **Joseph Gangoué Piéboji 2007**, Caractérisation des B Lactamases et leur inhibition par les extrait de plantes médicinales , Thèse de doctorat en Biochimie ,Université de liege , 127 P.
- **Hamadache Noura , 2011** , Criblage des extraits phénoliques d'origine végétale doues d'activité antibactérienne, Université A/MIRA de Bejaia , Thèse de magister en Biochimie appliqué

- **Hessas Thafsouth , Simoud Sounia , 2018** , Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp*, Thèse de docteur en pharmacie , Université Tizi Ouzou , 148 P .

- Houazene Mounira, Alem Ouerdia ,2017** , Etude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des tanins du marrube blanc et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait tannique , Memoire de master Chimie pharmaceutique ,69 P.

- **Guessoum D et Lecheheb H, 2015**, Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urticadioica L.* Evaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire du Master. Option métabolisme secondaire et molécule bioactive, Université des Frères Mentouri-Constantine-Algérie, 46 p.

- **Karaali Wahiba , 2020** , Polycopie cours en pharmacologie , toxicologie .

- **Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO, 2004**, Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract, P 179-182.

- **Khadija Marri , 2019** , Strategies actuelles de lutte contre l'antibiorésistance , Thèse de docteur en pharmacie , Université Mohammeds , 194 P.

- **Livendron J, 1996** , Les métabolites secondaires des plantes, Ed. Dunod, 320 P.

- **Lucie Mangin , 2016**,Antibiotiques et résistances : enquête sur les connaissances et les comportements du grand public , 125 P .

- **M Cowan ,1999**, Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews, p 564-570.

- **Mamadou Aïssa Jazy, 2018**, Chromatographie Sur Couche Mince Et Activité Antiradicalaire D'extraits De *Pupalia Lappacea (L.) Juss.* Amaranthaceae,16 P.

- **Markham , Neyfakh,2001**, Résistance aux médicaments induite par l'efflux chez les bactéries Gram-positives , 504 P.

- **Markham K. R., 1982**, Techniques of flavonoids identification, Academic press, London. Chap. 1 and 2 , P 1-113.

- **Meddour A, Yahia M, Benkiki1 N, Ayachi A, 2013**, Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa l*, Lebanese Science Journal, 14 P .

- **Mehdi Saadaoui , 2008** , La fréquence des bactéries multi résistante a l'hôpital Hassan ii de Settat , Thèse de doctorat en Pharmacie Université Mohammed V , 121 P.
- **Mellouk K, 2013**, Étude des activités antioxydante et antimicrobienne des flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie aérienne de *Pituranthoschloranthus*(Guezzeh) de la région de Biskra. Mémoire de Maste, Option alimentation et nutrition. Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen-Algérie , 57 p.
- **Merzouk Meriem ,2019** , Contribution à l'étude phytochimique des plantes médicinales Algériennes : le genre *Centaurea*, les flavonoides et leurs méthodes d'identification , Mémoire en Chimie Organique , Université Mohamed Seddik Ben Yahia-Jijel
- **Muylaert A, Mainil j ,2013**, Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur « contagiosité ».Annales de Medecine vétérinaire ,P 109-123.
- **N. Mesaros1 , F Van Bambeke1 , et Al , 2005**, L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne : état de la question et implications, 8P.
- **Ouidir Soraya, 2018** , Evaluation de l'activité antibactérienne del'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*vis-à-vis des bactériesresponsable d'infections urinaires , Mémoire de maste Biotechnologie Microbienne , P82 .
- **Podsedek A ,2007**, Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review, Vol ;40 , P 1-11.
- Quezel p., Santa S, 1963** , Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, P 590-593.
- Sibylle Bevilacqua , 2011**, Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé) , Thèse de doctorat , Université Nancy, P140.
- **SOMIPEV, 2017**, Le-guide-pratique-des-bacteries-pathogenes.
- **Sophie Ziai ,2014**, La resistance bacterienne aux antibiotiques ; Apparition et strategies de lutte, Thèse d'exercice pour le diploma d'etet e docteur en pharmacie , université de, P 151.
- **Stanković MS, 2011**, Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxydant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts
- **Tiwari et al., 2005** , Invasive alien plant species: a threat to biodiversity and agriculture in Nepal , 13P .

- **Toure Daouda , 2015** , Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de cote d'ivoire , P153.
- **Vanhaelen M., Vanhaelen-Fasté R. 1980**, High performance liquid gas and thin layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. *Journal of chromatography* , 187 P.
- **Vidal ,2015**, Les effets indésirables des antibiotiques
- **Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009** , Recherche Synergy : approcher une nouvelle génération de produits phytopharmaceutiques , 97 P.

Thème: L'investigation- *in vitro*- de l'effet de la polythérapie sur des bactéries pathogènes présentant le phénotype multi -drogue résistance (MDR)

Résumé

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet inhibiteur de la plante médicinale *Centaurea jacea* et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Thymus.sp* sur la résistance ou la multirésistance (MDR) des bactéries pathogènes aux antibiotiques.

Le screening phytochimique sur l'EMCJ et l'EBCJ a révélé que cette plante contient : des alcaloïdes, des saponosides, des tanins totaux et galliques, des sucres réducteurs, des flavonoïdes, des polyphénols et des caroténoïdes.

L'étude quantitative a montré que l'EBCJ **représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes** (24.84 mgEQ/gE) **en comparaison avec** l'EMCJ (21.8 mgEQ/gE), également le dosage a prouvé que l'EBCJ est le plus riche en polyphénols (413 mg EQ/g d'extrait) par apport à l'EMCJ (65.47 mg EQ/g d'extrait). Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM de l'EMCJ et l'EBCJ a confirmé la richesse de ces deux extraits en tanins, saponosides et flavonoïdes.

Pour l'activité de l'inhibition de la résistance, un test a été effectué sur cinq souches quatre Gram- (*E.coli*, *Pseudomonas.aeruginosa*, *Enterobacter.sp* et *Klebsiella.pneumoniae*) et une Gram+ *Staphylococcus.aureus* en adoptant la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats obtenus avec l'EBCJ et l'huile essentielle de *thymus.sp* sont tous négatifs. Alors que l'EMCJ montre un effet inhibiteur de l'antibio-résistance à la pénicilline G (9mm) sur *E.coli*, **et même pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui donne un effet très important sur *S.aureus* (45 mm) et sur *E.coli* (17mm).**

Cependant les résultats obtenus révèlent que **l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*** a une activité antibactérienne sur *Enterobacter.sp* (13mm) et *K.pneumoniae* (12mm) , tandis que l'huile essentielle de *Thymus.sp* montre une activité antibactérienne sur seulement *S.aureus* (13mm).

La présente étude suggère que l'EMCJ et **l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*** peuvent atténuer la résistance d'*E.coli* à la pénicilline G. Ainsi que **l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* peut** reverser d'une manière importante la résistance de ***S.aureus*** à la pénicilline G. Donc, les deux plantes (*Centaurea Jacea* et ***Syzygium aromaticum***) peuvent être une source prometteuse de nouvelles substances inhibitrices de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Mots clés: Résistance bactérienne, polythérapie, antibiotiques, *Centaurea jacea*, ***Syzygium aromaticum***, *Thymus.sp*, métabolites secondaires.

Laboratoire: de microbiologie, Université Abbès Laghrour kenchela

