

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ MOULOU MAMMERI DE TIZI OUZOU  
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE – MICROBIOLOGIE**



**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Filière : Science de la nature et de la vie**

**Option : biotechnologie microbienne**

**Activité antibactérienne de l'extrait aqueux des  
feuilles de *thymus vulgaris* de la région de Tizi -  
Ouzou.**

**Présenté par :**

**Mlle AMEUR Souad**

**Mlle IDIR Rahma**

**Devant le jury compose de :**

- |   |     |       |
|---|-----|-------|
| • Promoteur : M <sup>r</sup> MOUALEK. I     | MCA | UMMTO |
| • Président : M <sup>r</sup> AMEUR. A       | MCB | UMMTO |
| • Examinatrice : M <sup>me</sup> YAKOUBI. S | MAA | UMMTO |

**Années universitaire : 2026/2027**

## *Remerciements*

**Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire dans le cadre de notre parcours pédagogique.**

**Tout d'abord, nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrant, Monsieur Moualek, pour son accompagnement rigoureux, sa disponibilité, ses conseils avisés et son soutien constant tout au long de ce travail. Son encadrement a été déterminant dans l'aboutissement de ce mémoire.**

**Nous tenons également à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail, ainsi que pour leurs remarques pertinentes et constructives.**

**Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble des enseignants du département de Biochimie et Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri, pour la qualité de leur enseignement et pour les connaissances qu'ils nous ont transmises tout au long de notre formation.**

**Nous remercions également le personnel administratif et technique pour leur aide et leur disponibilité.**

**À toutes celles et à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, nous adressons nos plus sincères remerciements.**

## *Dédicace*

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à ceux à qui je ne pourrai jamais exprimer pleinement mon amour, quels que soient les mots.

À l'homme de ma vie, mon précieux cadeau de Dieu, qui représente pour moi un exemple de courage et de sacrifice, et à qui je dois ma réussite : mon cher papa.

À la femme qui a toujours été présente, qui a tout donné sans jamais compter, et dont l'amour et le soutien m'ont permis d'avancer : ma chère maman.

À mes chers frères et sœurs, Farid, Nacer, Nawel et Celia, pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence constante tout au long de mon parcours.

À mes amies, qui ont partagé avec moi les moments de joie comme les moments difficiles, et qui ont toujours su m'encourager.

À mon binôme de mémoire Rahma, pour sa collaboration, son aide précieuse et son soutien durant la réalisation de ce travail.

À toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci à tous pour votre amour et votre soutien.

## *Dédicace*

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à ceux à qui je ne pourrai jamais exprimer pleinement mon amour, quels que soient les mots.

À l'homme de ma vie, mon précieux cadeau de Dieu, qui représente pour moi un exemple de courage et de sacrifice, et à qui je dois ma réussite : mon cher papa.

À la femme qui a toujours été présente, qui a tout donné sans jamais compter, et dont l'amour et le soutien m'ont permis d'avancer : ma chère maman.

À mes chers sœurs, thinhinane, thiziri, Kahina et Amina, pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence constante tout au long de mon parcours.

À mes amies, qui ont partagé avec moi les moments de joie comme les moments difficiles, et qui ont toujours su m'encourager.

À mon binôme de mémoire Souad, pour sa collaboration, son aide précieuse et son soutien durant la réalisation de ce travail.

À toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci à tous pour votre amour et votre soutien.

## **Sommaire**

# Sommaire

Remerciements

Dédicace

Dédicace

Introduction .....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1.1. Les plantes médicinales : définition et importance .....	3
1.2. Présentation botanique de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	4
1.2.1. Classification systématique.....	4
1.2.2. Description morphologique .....	4
▪ Tiges .....	4
Feuilles .....	4
Inflorescence .....	5
Fleurs .....	5
Fruit et graines.....	5
1.2.3. Répartition géographique et écologie .....	7
1.3. Composition phytochimique de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	8
1.3.1. Fraction volatile : huiles essentielles .....	8
1.3.2. Fraction non volatile : composés phénoliques .....	8
a) Acides phénoliques .....	8
b) Flavonoïdes : .....	9
c) Tanins .....	9
d) Autres composés .....	9
1.5. Métabolites secondaires de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	9
1.5.1. Les acides phénoliques .....	12
1.5.1.1. Classification des acides phénoliques .....	13
1.5.1.2. Acides hydroxybenzoïques .....	13
• L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).....	14
• L'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) .....	14
• L'acide p-hydroxybenzoïque .....	14
• L'acide syringique et l'acide vanillique .....	14
1.5.1.3. Acides hydroxycinnamiques .....	15
• L'acide rosmarinique .....	15
• L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) .....	15
• L'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique.....	15
• L'acide p-coumarique (acide 4-hydroxycinnamique .....	15
• L'acide chlorogénique (ester 5-O-caféoylquinique .....	16

1.5.2. Les stilbènes.....	16
1.5.3. Les flavonoïdes .....	17
• Flavones .....	17
• Flavanones :.....	17
1.5.4. Les coumarines.....	18
1.5.5. Les tanins .....	19
1.5.5.1. Tanins hydrolysables .....	19
1.5.5.2. Tanins condensés (proanthocyanidines).....	20
1.5.6. Les lignanes.....	21
1.5.7. La lignine .....	22
1.6. Rôles et fonctions biologiques des composés phénoliques .....	23
1.6.1. Fonctions biologiques chez les végétaux .....	23
A. Fonctions constitutives (permanentes) : .....	23
B. Fonctions inductibles (réponse aux stress) :.....	24
1.6.2. Propriétés biologiques d'intérêt chez l'être humain .....	24
Activité antioxydante :.....	25
Activité anti-inflammatoire.....	25
Activité antibactérienne.....	26
Protection cardiovasculaire .....	26
Activité anticancéreuse .....	26
Neuroprotection .....	26
1.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques : contexte et enjeux .....	27
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>28</b>
2.1. Cadre expérimental .....	28
2.2. Matériel végétal .....	28
2.2.1. Récolte et identification botanique .....	28
2.2.2. Préparation du matériel végétal.....	28
2.3. Matériel microbiologique .....	29
2.3.1. Souches bactériennes .....	29
2.3.2. Milieux de culture et réactifs .....	29
2.4. Méthodes.....	30
2.4.1. Préparation de l'extrait aqueux .....	30
2.4.2. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu .....	30
2.4.3. Évaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose .....	31
2.4.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .....	32
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>33</b>
3.1. Rendement d'extraction .....	33

3.2. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	33
3.2.1. Validation de la courbe d'étalonnage.....	33
3.2.2. Teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux .....	34
3.3. Activité antibactérienne par diffusion sur gélose.....	37
3.3.1. Résultats des zones d'inhibition .....	37
3.3.2. Discussion des résultats de diffusion.....	38
3.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .....	41
3.4.1. Résultats des CMI .....	41
3.4.2. Discussion des valeurs de CMI .....	42
3.5. Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antibactérienne .....	45
<b>Conclusion</b> .....	46

## **Références bibliographique**

## **Annexes**

## *Liste des abréviations*

APG IV	Angiosperm Phylogeny Group IV (classification des plantes, 2016)
ATCC	American Type Culture Collection
BLSE	Bêta-lactamases à spectre étendu
B. cereus	Bacillus cereus
CMI	Concentration minimale inhibitrice
E. coli	Escherichia coli
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GN	Gélose nutritive
HPLC-DAD-MS/MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes et à la spectrométrie de masse en tandem
LPS	Lipopolysaccharides
MH	Gélose Mueller-Hinton
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PGG	Pentagalloylglucose
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
RAM	Résistance aux antimicrobiens
SARM	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline
S. aureus	Staphylococcus aureus
T. vulgaris	Thymus vulgaris
TPC I	Total Phenolic Content (teneur en polyphénols totaux)
UFC	Unité formant colonie
UV-B	Rayonnements ultraviolets de type B
ZI	Zone d'inhibition
FC	Méthode de folin- Ciocalteu
EAG	Equivalents acide gallique
ES	Extrait sec

## *Liste des figures*

Figure	Titre
1	Morphologie de <i>Thymus vulgaris</i> L.
2	Distribution géographique de <i>Thymus vulgaris</i> dans le monde.
3	Représentation schématique du métabolisme des acides phénoliques issus de la voie shikimate.
4	Structure de base des flavonoïdes.
5	Structure des tanins hydrolysables.
6	Structure des tanins condensés.
7	Structure chimique schématique de la lignine.
8	Représentation cumulative des rôles des flavonoïdes en santé humaine et en agriculture.
9	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

## *Liste des tableaux*

Tableaux	Titre
1	Classification systématique de <i>Thymus vulgaris</i> L.
2	Principales classes de métabolites secondaires identifiées chez <i>Thymus vulgaris</i> L. et leurs activités biologiques documentées.
3	Souches bactériennes de référence utilisées dans l'étude.
4	Comparaison des teneurs en polyphénols totaux de <i>T. vulgaris</i> avec la littérature.
5	Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux de <i>T. vulgaris</i> et de la gentamicine.
6	Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis des souches bactériennes de référence et classification de l'activité.

## RÉSUMÉ

La résistance croissante des bactéries pathogènes aux antibiotiques conventionnels constitue l'une des menaces les plus préoccupantes pour la santé publique mondiale, incitant la communauté scientifique à explorer des alternatives thérapeutiques d'origine naturelle. Dans ce contexte, les plantes médicinales, riches en métabolites secondaires bioactifs, représentent un réservoir prometteur de nouvelles molécules antimicrobiennes. La présente étude s'inscrit dans cette démarche en s'intéressant à *Thymus vulgaris* L. (Lamiacée), communément appelé **Thym commun** en français, الزعتر en arabe et ⵓⴽⵓⵏⵉ (Azukni) en kabyle, une plante aromatique et médicinale largement utilisée en phytothérapie dans la région de Tizi Ouzou (Algérie).

Ce travail a pour objectifs de quantifier la teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* L. et d'évaluer son activité antibactérienne in vitro vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence : *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Bacillus cereus* ATCC 10876.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé une teneur de  $110 \pm 0,0036$  mg équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES), témoignant d'une richesse appréciable en composés phénoliques. L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose a mis en évidence des zones d'inhibition variables selon les souches, comprises entre  $12,00 \pm 1,00$  et  $14,23 \pm 0,68$  mm à une concentration de 250 mg/mL.

La bactérie la plus sensible s'est avérée être *Bacillus cereus*, suivie de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a confirmé ces observations, avec des valeurs variant de 1,25 mg/mL à 10 mg/mL.

L'activité antibactérienne observée est probablement liée à la présence de composés phénoliques hydrosolubles, notamment des acides phénoliques et des flavonoïdes glycosylés, capables d'altérer l'intégrité membranaire bactérienne et d'inhiber certaines enzymes métaboliques essentielles. Ces résultats confirment le potentiel de *Thymus vulgaris* L. comme source de biomolécules d'intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques naturelles contre les infections bactériennes.

**Mots-clés :** *Thymus vulgaris* L., Thym commun, الزعتر, ⵓⴽⵓⵏⵉ (Azukni), extrait aqueux, polyphénols totaux, activité antibactérienne, CMI, Folin-Ciocalteu, Tizi Ouzou.

## ABSTRACT

The increasing resistance of pathogenic bacteria to conventional antibiotics represents one of the most serious threats to global public health, prompting the scientific community to search for natural therapeutic alternatives. In this context, medicinal plants, rich in bioactive secondary metabolites, constitute a promising source of new antimicrobial compounds. The present study focuses on *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), commonly known as **Common Thyme** in English, **Thym commun** in French, الزعتر in Arabic, and ⵓⴽⵓⵏⵉ (Azukni) in Kabyle, an aromatic and medicinal plant widely used in traditional medicine in the Tizi Ouzou region of Algeria.

The objectives of this study were to quantify the total polyphenol content of the aqueous leaf extract of *Thymus vulgaris* L. and to evaluate its in vitro antibacterial activity against four reference bacterial strains: *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, and *Bacillus cereus* ATCC 10876.

The determination of total polyphenols using the Folin–Ciocalteu colorimetric method revealed a content of  $110 \pm 0.0036$  mg gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g DE), indicating a considerable richness in phenolic compounds. Antibacterial activity assessed by the agar diffusion method showed inhibition zones ranging from  $12.00 \pm 1.00$  to  $14.23 \pm 0.68$  mm at a concentration of 250 mg/mL.

Among the tested strains, *Bacillus cereus* exhibited the highest sensitivity, followed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. The minimum inhibitory concentration (MIC) values confirmed these findings, ranging from 1.25 mg/mL to 10 mg/mL.

The observed antibacterial activity is likely associated with the presence of water-soluble phenolic compounds, particularly phenolic acids and glycosylated flavonoids, which are known to disrupt bacterial membrane integrity and inhibit key metabolic enzymes. These findings highlight the potential of *Thymus vulgaris* L. as a valuable source of bioactive molecules for the development of novel natural therapeutic strategies against bacterial infections.

**Keywords :** *Thymus vulgaris* L., Common Thyme, Thym commun, الزعتر, ⵓⴽⵓⵏⵉ (Azukni), aqueous extract, total polyphenols, antibacterial activity, MIC, Folin–Ciocalteu, Tizi Ouzou.

## المخلص

تُعدّ المقاومة المتزايدة للبكتيريا الممرضة للمضادات الحيوية التقليدية من أخطر التهديدات التي تواجه الصحة العامة على المستوى العالمي، مما دفع المجتمع العلمي إلى البحث عن بدائل علاجية ذات أصل طبيعي. وفي هذا السياق، تمثل النباتات الطبية، الغنية بالمستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيًا، مصدرًا واعدًا لاكتشاف جزيئات جديدة ذات خصائص مضادة ، (*Thymus vulgaris* L.) للميكروبات. وتندرج هذه الدراسة ضمن هذا التوجه من خلال الاهتمام بنبات الزعتر الشائع ، وهو نبات (*Azukni*) ، وبالعربية باسم الزعتر، وبالقبائلية باسم *Thym commun* المعروف بالفرنسية باسم ، وثوَّق استعماله العلاجي التقليدي على نطاق واسع في منطقة (Lamiaceae) عطري وطبي ينتمي إلى الفصيلة الشفوية ، تيزي وزو بالجزائر.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد محتوى البوليفينولات الكلية في المستخلص المائي لأوراق نبات الزعتر الشائع (*Thymus vulgaris* L.) ، وتقييم نشاطه المضاد للبكتيريا مخبريًا تجاه أربع سلالات بكتيرية مرجعية هي (*Escherichia coli* ATCC 25923 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Bacillus cereus* ATCC 10876).

قيمة بلغت  $110 \pm$  (Folin-Ciocalteu) أظهر تقدير محتوى البوليفينولات الكلية باستعمال طريقة فولين-سيوكالتي  $0.0036$  ملغ مكافئ حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص الجاف، مما يدل على غنى المستخلص بالمركبات الفينولية. كما بيّن تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة الانتشار على الوسط الهلامي (الأغار) وجود مناطق تثبيط متفاوتة حسب السلالة البكتيرية، تراوحت بين  $1.00 \pm 12.00$  و  $0.68 \pm 14.23$  مم عند تركيز 250 ملغ/مل.

، ثم *Pseudomonas aeruginosa*، تلتها *Bacillus cereus* وقد تبين أن أكثر السلالات حساسية للمستخلص كانت هذه (CMI) كما أكدت نتائج تحديد التركيز الأدنى المثبط. *Escherichia coli*، وأخيرًا *Staphylococcus aureus* الملاحظات، حيث تراوحت القيم بين 1.25 ملغ/مل و 10 ملغ/مل.

وتُعزى الفعالية المضادة للبكتيريا المسجلة إلى احتواء المستخلص على مركبات فينولية قابلة للذوبان في الماء، خاصة الأحماض الفينولية والفلافونويدات، القادرة على التأثير في سلامة الأغشية الخلوية البكتيرية وتعطيل بعض الإنزيمات كمصدر طبيعي (*Thymus vulgaris* L.) الأيضية الأساسية. وتؤكد هذه النتائج الإمكانيات الواعدة لنبات الزعتر الشائع للمركبات الحيوية ذات النشاط المضاد للبكتيريا، وإمكانية استغلاله في تطوير استراتيجيات علاجية جديدة لمكافحة العدوى البكتيرية.

، المستخلص (*Azukni*) ، *Thym commun* ، (*Thymus vulgaris* L.) الزعتر الشائع :الكلمات المفتاحية ، تيزي وزو (CMI) المائي، البوليفينولات الكلية، النشاط المضاد للبكتيريا، التركيز الأدنى المثبط.

## **Introduction**

### Introduction

Les maladies infectieuses d'origine bactérienne demeurent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays en développement où l'accès aux soins de santé reste limité. L'émergence et la dissémination rapide de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques, phénomène qualifié de crise antibiotique mondiale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) complexifient considérablement la prise en charge thérapeutique des infections et représentent une menace sanitaire majeure (WHO, 2022). Des agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* multirésistante ou *Escherichia coli* productrice de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) illustrent la gravité de cette situation (Laxminarayan et al., 2013).

Face à ce constat préoccupant, la recherche de nouvelles molécules antibactériennes issues de ressources naturelles s'impose comme une stratégie incontournable. Les plantes médicinales, utilisées depuis des millénaires par les civilisations humaines et constituant encore aujourd'hui le socle des soins de santé primaires pour plus de 80 % de la population mondiale selon l'OMS (2013), offrent une source inépuisable de composés bioactifs aux structures chimiques originales et aux mécanismes d'action potentiellement innovants. Leurs métabolites secondaires polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes exercent des activités biologiques diversifiées dont l'activité antimicrobienne, reconnue et documentée par un corpus scientifique croissant (Newman & Cragg, 2016).

L'Algérie, dotée d'une flore médicinale remarquablement riche et diversifiée en raison de la variété de ses étages climatiques méditerranéen, semi-aride, aride et saharien, constitue un terrain particulièrement propice à la valorisation ethnobotanique et phytopharmacologique de ses ressources végétales (Miara et al., 2017). Parmi les plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, *Thymus vulgaris* L. (famille des Lamiacées) occupe une place de premier plan. Couramment appelé thym, cet arbrisseau vivace est employé par la population locale, notamment dans la région de Kabylie (Tizi Ouzou), pour le traitement empirique des infections respiratoires, des affections digestives et des plaies cutanées (El Ouali Lalami et al., 2013 ; Benarfa, 2005).

Sur le plan phytochimique, *T. vulgaris* est caractérisé par une composition riche et complexe, dominée par des huiles essentielles dont les principaux constituants sont le thymol et le carvacrol, des composés phénoliques non volatils (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins)

ainsi que d'autres classes de métabolites secondaires. Si les propriétés biologiques des huiles essentielles de thym ont fait l'objet d'une attention scientifique soutenue, les extraits aqueux qui représentent pourtant la forme galénique la plus proche des préparations traditionnelles (infusions, décoctions) restent relativement peu explorés sur le plan de l'activité antibactérienne et de la composition phénolique (Salehi et *al.*, 2018 ; Taher et *al.*, 2021).

C'est dans ce contexte scientifique et socio-sanitaire que s'inscrit la présente étude, réalisée au sein des laboratoires de physicochimie et de microbiologie du Département des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Ce travail poursuit deux objectifs principaux : (1) quantifier la teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* L. récoltées dans la région de Tizi Ouzou, afin d'établir une corrélation avec son potentiel bioactif ; et (2) évaluer *in vitro* son activité antibactérienne vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence incluant des représentants Gram-positifs (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) et Gram-négatifs (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Ce travail contribue à la valorisation scientifique d'une plante médicinale locale, à la caractérisation de ses propriétés antimicrobiennes sous sa forme d'usage traditionnel aqueux, et à l'enrichissement de la base de données phytopharmacologique algérienne.

Ce mémoire est structuré en quatre parties principales. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique consacrée à la plante étudiée, à ses propriétés phytochimiques et biologiques ainsi qu'aux notions générales relatives à l'activité antimicrobienne. Le deuxième chapitre décrit les matériels et méthodes utilisés pour la préparation de l'extrait aqueux et l'évaluation de son activité biologique. Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus et à leur discussion à la lumière des données de la littérature. Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale résumant les principaux résultats et les perspectives.

## **Synthèse bibliographique**

### Synthèse bibliographique

#### 1.1. Les plantes médicinales : définition et importance

L'Organisation Mondiale de la Santé définit une plante médicinale comme « toute plante dans laquelle une ou plusieurs de ses parties contiennent des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs d'hémi synthèse de médicaments utiles » (WHO, 2013). Cette définition souligne la dualité de leur intérêt : usage direct en phytothérapie et utilisation comme matière première pour l'industrie pharmaceutique (WHO, 2013).

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est attesté depuis au moins 5 000 ans, des premières tablettes sumériennes aux papyrus égyptiens, en passant par la médecine chinoise traditionnelle et l'Ayurveda indien. Aujourd'hui, malgré les progrès de la pharmacologie de synthèse, les plantes médicinales demeurent le principal recours thérapeutique pour une large part de la population mondiale. L'OMS estime qu'environ 80 % de la population des pays en développement dépend encore de la médecine traditionnelle à base de plantes pour ses soins de santé primaires (WHO, 2013). De surcroît, plus de 50 % des médicaments commercialisés au cours des 30 dernières années sont d'origine naturelle ou sont inspirés de composés naturels (Newman & Cragg, 2016).

L'intérêt scientifique pour les plantes médicinales repose sur leur richesse en métabolites secondaires composés organiques non indispensables à la croissance et au développement primaire, mais jouant un rôle crucial dans l'interaction de la plante avec son environnement biotique et abiotique. Ces métabolites incluent notamment les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilbènes), les terpénoïdes (mono-, sesqui-, di- et triterpènes), les alcaloïdes et les composés soufrés. Leur diversité structurale considérable leur confère un vaste spectre d'activités biologiques, incluant des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Bouyahya et *al.*, 2017).

En Algérie, les études ethnobotaniques ont répertorié plusieurs centaines d'espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle. La région de Tizi Ouzou, en particulier, est reconnue pour la richesse et la diversité de sa flore médicinale montagnarde, au sein de laquelle les Lamiacée occupent une place prépondérante (Miara et *al.*, 2017). La valorisation scientifique de ces ressources représente un enjeu majeur pour le développement de la pharmacopée algérienne et la découverte de nouvelles alternatives thérapeutiques.

### 1.2. Présentation botanique de *Thymus vulgaris* L.

#### 1.2.1. Classification systématique

La position taxonomique de *Thymus vulgaris* L. dans le système de classification APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) est présentée dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : Classification systématique de *Thymus vulgaris* L. selon le système APG IV (2016).

Rang taxonomique	Taxon
Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Eudicots
Clade	Astérides
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i> L.
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L.

#### 1.2.2. Description morphologique

*Thymus vulgaris* L. est un sous-arbrisseau vivace à port buissonnant, atteignant 10 à 50 cm de hauteur selon les conditions écologiques et le chémotype considéré (Stahl-Biskup & Sáez, 2002). Sa base est nettement lignifiée, caractère distinctif des espèces pérennes de la famille des Lamiaceae.

- **Tiges** : quadrangulaires, dressées ou étalées-ascendantes, blanchâtres et pubescentes à l'état jeune, progressivement lignifiées à la base avec l'âge. La section carrée des tiges est un caractère distinctif de la famille des Lamiaceae, lié à la présence de collenchyme aux angles.
- **Feuilles** : opposées et décussées, de forme oblongue à lancéolée ou sublinéaire, mesurant 5 à 10 mm de long pour 0,8 à 2,5 mm de large. Leur couleur est vert grisâtre, avec des marges nettement révolutes (roulées vers la face inférieure). La face inférieure est densément couverte de trichomes tomenteux blanchâtres, qui masquent partiellement les glandes sécrétrices. La présence de glandes épidermiques

schizolysigènes, visibles en transparence par ponctuations translucides, est responsable de la richesse en huiles essentielles. Ces trichomes glandulaires capités et peltés jouent un rôle majeur dans la synthèse, le stockage et la libération des composés volatils (Vouillamoz et *al.*, 2011 ; Hrytsyna et *al.*, 2019).

- **Inflorescence** : de type thyrsoïde, composée de faux verticilles axillaires (verticillastres) disposés en grappes terminales allongées. Chaque verticillastre est constitué de 3 à 7 fleurs insérées dans les aisselles de bractées foliacées opposées-décussées (Vouillamoz et *al.*, 2011 ; Hrytsyna et *al.*, 2019).
- **Fleurs** : hermaphrodites, zygomorphes, de couleur rose-lilacé à blanche. La corolle est gamopétale bilabée, avec une lèvre supérieure courte et entière ou légèrement échancrée, et une lèvre inférieure trilobée. Le calice est gamosépale, bilabié et couvert de trichomes. L'androcée comprend 4 étamines didynames (2 longues + 2 courtes). Le gynécée est constitué d'un ovaire supère tétramère, d'un style filiforme et d'un stigmate bifide. La pollinisation est principalement entomophile, favorisée par la structure de la fleur (Hrytsyna et *al.*, 2019).
- **Fruit et graines** : tétrakène (schizocarpe se dissociant en 4 akènes), chaque akène étant ovoïde, brun foncé à noir, de 0,5 à 0,7 mm de diamètre. La dissémination est principalement anémochore. (Vouillamoz et *al.*, 2011)

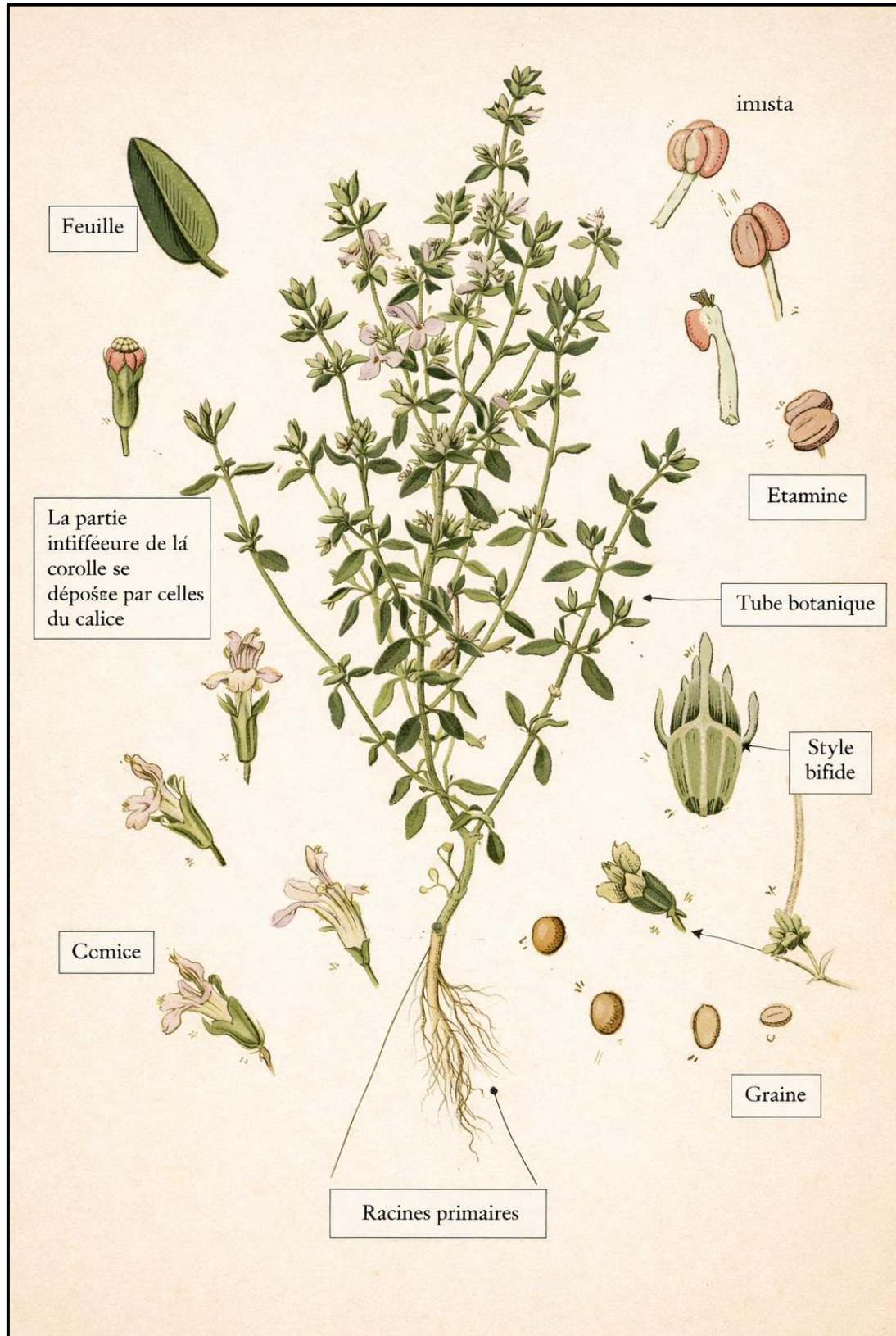


Figure1 : Morphologie de *Thymus vulgaris* L (Hrytsyna et al., 2019).

### 1.2.3. Répartition géographique et écologie

*Thymus vulgaris* est une espèce originaire du bassin méditerranéen occidental, dont l'aire de répartition naturelle s'étend de la Péninsule Ibérique au sud de l'Italie, en passant par la France méridionale (Stahl-Biskup & Sáez, 2002). L'espèce colonise préférentiellement les garrigues, pelouses sèches et zones rocheuses sur sols calcaires ou siliceux, bien drainés, à exposition ensoleillée. Sa résistance à la sécheresse et au froid modéré lui permet de s'adapter à une large gamme de conditions édaphoclimatiques (Stahl-Biskup & Sáez, 2002).

En Algérie, *T. vulgaris* est présent principalement dans les zones à influence méditerranéenne du nord du pays. Il est recensé dans plusieurs wilayas, notamment Tizi Ouzou, Béjaïa, Jijel, Skikda, Sétif et Batna, où il croît spontanément dans les zones montagneuses et les maquis dégradés (Baba Aïssa, 1991). La région de Tizi Ouzou, caractérisée par un étage bioclimatique subhumide à semi-aride d'altitude, offre des conditions favorables à sa prolifération.

Un aspect fondamental de la biologie de l'espèce est l'existence de chémotypes, définis comme des populations génotypiquement similaires mais produisant des compositions chimiques qualitativement et quantitativement différentes en huiles essentielles. Les principaux chémotypes de *T. vulgaris* reconnus dans la littérature sont le chémotype thymol, le chémotype carvacrol, le chémotype linalol, le chémotype géraniol et le chémotype thujanol. Cette diversité chimique intraspécifique, sous influence génétique et environnementale, explique en partie la variabilité des activités biologiques rapportées dans la littérature (Vernet et al., 1977 ; Stahl-Biskup & Sáez, 2002).



**Figure 2 :** Distribution géographique de *Thymus vulgaris* dans le monde (le cercle noir représente la zone de distribution) (Stahl-Biskup et Sáez, 2002).

### 1.3. Composition phytochimique de *Thymus vulgaris* L.

La composition chimique des parties aériennes de *Thymus vulgaris* est remarquablement riche et complexe, influencée par des facteurs intrinsèques (génotype, chémotype, stade phénologique) et extrinsèques (conditions pédoclimatiques, mode de séchage, méthode d'extraction) (Stahl-Biskup & Sáez, 2002 ; Hudaib *et al.*, 2002). Elle comprend deux grandes catégories de composés : la fraction volatile (huiles essentielles) et la fraction non volatile (composés phénoliques et autres métabolites secondaires) (Burt, 2004 ; Miguel, 2010).

#### 1.3.1. Fraction volatile : huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent la fraction la plus étudiée de *T. vulgaris*. Leur teneur dans les feuilles et sommités fleuries varie généralement entre 0,5 et 3,6 % (v/m), selon le chémotype et les conditions de récolte. Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) révèlent une composition dominée par des monoterpènes phénoliques. Dans le chémotype thymol le plus répandu et le plus étudié, le thymol constitue le composé majoritaire (35 à 60 %), suivi du p-cymène (8 à 20 %), du  $\gamma$ -terpinène (5 à 15 %), du 1,8-cinéole (2 à 14 %) et du carvacrol (1 à 5 %) (Aljabeili *et al.*, 2018 ; Salehi *et al.*, 2018). Ces deux composés phénoliques thymol et carvacrol sont principalement responsables des propriétés antibactériennes puissantes des huiles essentielles de thym.

#### 1.3.2. Fraction non volatile : composés phénoliques

La fraction non volatile, extraite préférentiellement par des solvants polaires (eau, méthanol, éthanol), est dominée par des composés phénoliques qui peuvent être regroupés en plusieurs classes :

*a) Acides phénoliques* : Ils constituent une part importante de la fraction polyphénolique de *T. vulgaris*. Les acides hydroxycinnamiques sont prédominants, avec notamment l'acide rosmarinique un ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphényllactique qui est le composé phénolique majeur de nombreuses Lamiaceae. L'acide caféique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique sont également présents. Les acides hydroxybenzoïques (acide gallique, acide protocatéchique) sont présents en moindres proportions (Kowalska *et al.*, 2025 ; Roby *et al.*, 2013).

**b) Flavonoïdes** : Les flavonoïdes de *T. vulgaris* incluent principalement des flavones (lutéoline, apigénine et leurs glycosides), des flavonols (quercétine, kaempférol, rutine) et des flavanones. La lutéoline-7-glucoside et l'apigénine-7-glucoside ont été identifiées comme composés majeurs. Le cirsilineol et la sideritoflavone, flavones polyméthoxyées, sont également caractéristiques de l'espèce (Jain & Choudhary, 2022).

**c) Tanins** : On distingue les tanins hydrolysables (gallotanins, ellagitanins) et les tanins condensés (proanthocyanidines), ces derniers étant prédominants dans les feuilles. Ils contribuent significativement aux propriétés astringentes et antibactériennes des extraits (Coppo & Marchese, 2014).

**d) Autres composés** : Des coumarines (aesculétine, ombelliférone), des stilbènes en quantités mineures, des lignanes, ainsi que des terpénoïdes non volatils (acide ursolique, acide oléanolique) et des saponines complètent la composition phytochimique (Nieto et al., 2020).

Les teneurs en polyphénols totaux rapportées dans la littérature pour *T. vulgaris* présentent une grande variabilité selon le solvant d'extraction : de 54,21 mg EAG/g pour un extrait aqueux (Nateqi et al., 2018) jusqu'à 218,09 mg EAG/g pour un extrait au dichlorométhane (Yakhlef et al., 2011). Cette variabilité souligne l'importance du choix du solvant dans la caractérisation phytochimique.

### 1.5. Métabolites secondaires de *Thymus vulgaris* L.

*Thymus vulgaris* L. est une plante médicinale de la famille des Lamiaceae reconnue pour sa richesse exceptionnelle en métabolites secondaires composés organiques naturels qui, contrairement aux métabolites primaires (glucides, acides aminés, lipides), ne sont pas directement impliqués dans les processus fondamentaux de croissance et de développement végétal, mais jouent un rôle déterminant dans les interactions de la plante avec son environnement biotique et abiotique (Croteau et al., 2000 ; Li et al., 2020). Ces molécules constituent le fondement phytochimique de ses propriétés thérapeutiques et représentent une source majeure de composés bioactifs d'intérêt pharmaceutique.

La biosynthèse des métabolites secondaires chez *T. vulgaris* est finement régulée par des facteurs environnementaux et des signaux endogènes. Elle est notamment induite ou amplifiée en réponse à des stress biotiques (attaques microbiennes, herbivorie, compétition interspécifique) et abiotiques (rayonnements ultraviolets, sécheresse, température extrême, carences minérales). Cette plasticité biosynthétique est médiée par des voies de signalisation

faisant intervenir des phytohormones acide jasmonique, acide salicylique, éthylène qui activent l'expression de gènes codant pour des enzymes clés des voies de biosynthèse phénylpropanoïde, terpénoïde et alcaloïdique (Sussman et *al.*, 2020 ; Croteau et *al.*, 2000).

Ces composés sont distribués de manière différentielle dans les organes végétaux (feuilles, tiges, fleurs, racines, graines et fruits) selon leur rôle fonctionnel spécifique. Les feuilles, site principal de la photosynthèse et de l'évapotranspiration, concentrent notamment les trichomes glandulaires sécrétant d'huiles essentielles et les vacuoles riches en polyphénols, constituant ainsi les principaux réservoirs de métabolites secondaires bioactifs (Kong et *al.*, 2020 ; Vouillamoz et *al.*, 2011).

Au-delà de leurs fonctions écologiques, les métabolites secondaires de *T. vulgaris* exercent des activités biologiques d'importance pharmaceutique considérable : activités antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, antivirale, antifongique et anticancéreuse, confirmées par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Salehi et *al.*, 2018 ; De Rossi et *al.*, 2025). Les principales classes de métabolites secondaires identifiées chez cette espèce sont présentées dans le Tableau 2 et développées dans les sections suivantes.

**Tableau 2 :** principales classes de métabolites secondaires de *Thymus vulgaris* et de leurs activités biologiques rapportées dans la littérature (Salehi et al., 2018 ; Croteau et al., 2000).

Classe	Composés représentatifs	Localisation principale	Activités biologiques
Acides phénoliques	Ac. rosmarinique, caféique, férulique, gallique	Feuilles, tiges, fleurs	Antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire
Flavonoïdes	Lutéoline, apigénine, quercétine, rutine	Feuilles, fleurs, graines	Antioxydante, antimicrobienne, anticancéreuse
Stilbènes	Resvératrol et dérivés	Feuilles, racines, tiges	Antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire
Coumarines	Omébelliférone, aescuétine	Feuilles, racines, fruits	Antimicrobienne, anticoagulante, antifongique
Tanins (hydrolysables)	Gallotanins, éllagitanins	Feuilles, fruits, écorces	Astringente, antimicrobienne, antioxydante
Tanins (condensés)	Proanthocyanidines (PAC)	Feuilles, fruits, graines	Antioxydante, anti-inflammatoire, cardioprotectrice
Lignanes	Sécoisolaricirésinol, matairésinol	Racines, tiges, graines	Antioxydante, antimicrobienne, phytoestrogénique
Lignine	Polymère p-coumaryle/coniféryle/sinapyle	Tiges lignifiées, paroi cell.	Structurale, barrière mécanique
Huiles essentielles*	Thymol, carvacrol, p-cymène, $\gamma$ -terpinène	Trichomes glandulaires (feuilles)	Antibactérienne puissante, antifongique, antivirale

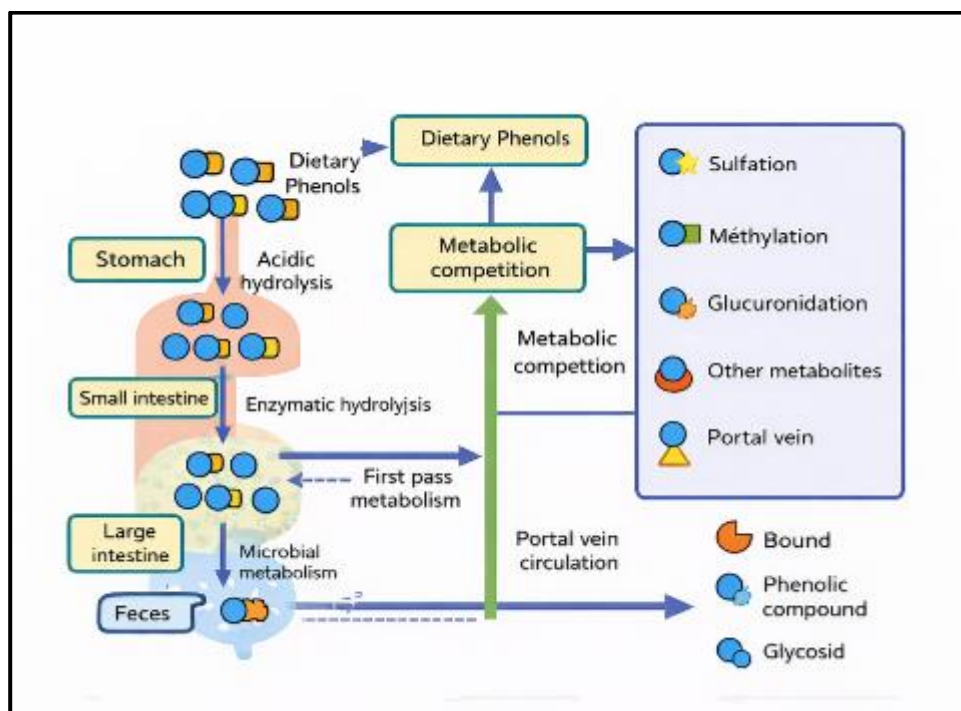
\* Non développées dans cette section ; voir section sur les huiles essentielles.

### 1.5.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent l'une des classes de métabolites secondaires les mieux représentées chez *Thymus vulgaris* et jouent un rôle central dans ses propriétés biologiques. Structuralement, ils se définissent par la présence d'un cycle aromatique benzénique substitué par au moins un groupement carboxyle ( $-\text{COOH}$ ) et un ou plusieurs groupements hydroxyles phénoliques ( $-\text{OH}$ ), dont le nombre et la position déterminent leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Huang et al., 2010). Ils appartiennent à la grande famille des polyphénols, dont le squelette carboné est issu de la voie shikimate et de la voie des phénylpropanoïdes.

Sur le plan fonctionnel, les acides phénoliques participent activement aux mécanismes de défense de la plante face à une large gamme de stress environnementaux. Leur accumulation, régulée positivement par les UV, la sécheresse, les blessures mécaniques et les infections microbiennes, génère une réponse de défense chimique rapide et efficace. Par ailleurs, ces composés contribuent à la régulation de nombreux processus physiologiques végétaux, incluant la croissance cellulaire, la signalisation hormonale et la formation de la paroi cellulaire par leur implication dans la biosynthèse de la lignine (Lattanzio et al., 2006 ; Li et al., 2020).

Chez *T. vulgaris*, les analyses phytochimiques ont permis d'identifier et de quantifier des teneurs en acides phénoliques pouvant atteindre 141,09 mg équivalent acide caféique par gramme d'extrait selon le solvant et les conditions d'extraction (Kowalska et al., 2025). L'acide rosmarinique ester de l'acide caféique et de l'acide (R)-3-(3,4-dihydroxyphényl)lactique est le composé phénolique non volatil dominant des Lamiaceae, y compris chez le thym, et représente un biomarqueur chimiotaxonomique de la famille (Petersen & Simmonds, 2003). Il est considéré comme le principal responsable des activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits polaires de cette espèce.



**Figure 3** : Représentation schématique du métabolisme des acides phénoliques issus de la voie du shikimate (Herrmann & Weaver, 1999 ; Grijalva et al., 2016).

#### 1.5.1.1. Classification des acides phénoliques

Les acides phénoliques de *T. vulgaris* sont classiquement répartis en deux grandes sous-catégories structurales, selon la nature du squelette carboné portant le noyau aromatique :

(i) **Les acides hydroxybenzoïques** : de structure C6–C1, dérivés de l'acide benzoïque, caractérisés par la présence d'un noyau phényle directement lié à la fonction carboxyle.

(ii) **Les acides hydroxycinnamiques** : de structure C6–C3, dérivés de l'acide cinnamique, possédant une chaîne latérale proénoïque ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ) en position para du noyau aromatique.

#### 1.5.1.2. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques forment un groupe structurellement homogène caractérisé par un squelette C6–C1 (cycle benzénique avec un groupe  $-\text{COOH}$  en position 1 et des substituants  $-\text{OH}$  en positions variables). Leur biosynthèse chez les plantes supérieures emprunte principalement la voie shikimate, via la phénylalanine et l'acide cinnamique, avec rétrogradation de la chaîne latérale à trois carbones. Parmi les composés de cette sous-classe

identifiés chez *T. vulgaris*, on distingue notamment (Huang et al., 2010 ; Kowalska et al., 2025)

:

- **L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque)** : l'un des acides phénoliques les plus simples et les plus répandus dans le règne végétal. Doté de trois groupements hydroxyles phénoliques, il présente une activité antioxydante puissante par donation d'hydrogène et chélation des ions métalliques pro-oxydants. Son activité antimicrobienne, documentée contre des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, repose sur la perturbation de l'intégrité membranaire bactérienne et l'inhibition d'enzymes métaboliques essentielles (Huang et al., 2010).
- **L'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque)** : issu de la dégradation de l'acide gallique et de la voie shikimate, il possède deux groupements catéchol conférant une forte capacité chélatrice des métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) et une activité antioxydante significative. Des études récentes lui attribuent également des propriétés antibactériennes et anticancéreuses (De Rossi et al., 2025).
- **L'acide p-hydroxybenzoïque** : le plus simple des acides hydroxybenzoïques, avec un seul groupement hydroxyle en position para. Il est un précurseur biosynthétique des ubiquinones (coenzymes Q) et intervient dans des processus de signalisation végétale. Ses propriétés antimicrobiennes sont principalement exploitées comme conservateur alimentaire (Huang et al., 2010).
- **L'acide syringique et l'acide vanillique** : composés méthoxylés présents en quantités variables, intervenant dans la biosynthèse de la lignine et dotés d'activités antioxydante et anti-inflammatoire (Kowalska et al., 2025).

Sur le plan mécanistique, les acides hydroxybenzoïques exercent leur activité antimicrobienne par plusieurs mécanismes convergents : (1) perturbation de la perméabilité sélective de la membrane cytoplasmique par interaction avec les phospholipides membranaires, entraînant la fuite des constituants intracellulaires ; (2) inhibition de la synthèse des acides nucléiques par intercalation dans la double hélice d'ADN bactérien ; (3) inhibition d'enzymes métaboliques essentielles (ATPases, déshydrogénases) ; et (4) chélation d'ions métalliques cofacteurs indispensables à l'activité enzymatique (Li et al., 2020 ; Huang et al., 2010).

### 1.5.1.3. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent la sous-classe d'acides phénoliques quantitativement dominante chez *Thymus vulgaris*. Leur structure C6–C3 comprend un noyau phényle substitué par des groupements hydroxyle et/ou méthoxyle, relié par une double liaison (configuration principalement trans/E) à un groupement carboxyle terminal. Cette insaturation leur confère une planarité moléculaire et des propriétés spectrales caractéristiques (absorption UV à 290-310 nm), ainsi qu'une plus grande réactivité antioxydante par rapport aux acides hydroxybenzoïques (Petersen & Simmonds, 2003).

Les principaux représentants identifiés chez *T. vulgaris* sont les suivants (Roby et al., 2013 ; Kowalska et al., 2025) :

- **L'acide rosmarinique** : ester dimérique de l'acide caféique avec l'acide (R)-3,4-dihydroxyphényllactique. C'est le composé phénolique non volatil le plus abondant chez la majorité des Lamiaceae, y compris *T. vulgaris*. Sa structure comportant quatre groupements hydroxyles phénoliques lui confère une activité antioxydante exceptionnelle, supérieure à celle de la vitamine C et de la vitamine E dans certains systèmes. Il est le principal contributeur aux propriétés anti-inflammatoires des extraits aqueux de thym, agissant par inhibition du complément, des prostaglandines (COX-2) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) (Petersen & Simmonds, 2003 ; Salehi et al., 2018).
- **L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique)** : précurseur de l'acide rosmarinique et des esters chlorogéniques. Il présente un cycle catéchol (orthodihydroxylation) conférant une forte activité antioxydante et chélatrice des ions Fe<sup>2+</sup>. Son activité antimicrobienne a été démontrée vis-à-vis de nombreux pathogènes bactériens et fongiques (Huang et al., 2010).
- **L'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique)** : composé méthoxylé présentant une stabilité chimique accrue grâce au groupement méthoxy, qui renforce son caractère lipophile. Il est très abondant dans les parois cellulaires végétales sous forme estérifiée (liaison ester avec les polysaccharides pariétaux). Ses propriétés antioxydantes, photoprotectrices et anti-inflammatoires sont bien documentées (Li et al., 2020 ; Kowalska et al., 2025).
- **L'acide p-coumarique (acide 4-hydroxycinnamique)** : précurseur biosynthétique commun de nombreux métabolites phénoliques (lignine, flavonoïdes, stilbènes). Monohydroxylé, il

présente une activité antioxydante et antimicrobienne modérée, mais joue un rôle structural et signalétique fondamental dans le métabolisme secondaire (Lattanzio *et al.*, 2006).

• **L'acide chlorogénique (ester 5-O-caféoylquinique)** : ester de l'acide caféique avec l'acide quinique, présent en quantités variables selon l'organe et le chémotype. Il est reconnu pour ses propriétés antioxydantes, hypoglycémiques et neuroprotectrices (De Rossi *et al.*, 2025).

L'ensemble de ces acides hydroxycinnamiques partage une caractéristique fondamentale : leur biosynthèse converge vers la formation d'esters et de glycosides qui constituent les formes de stockage et de transport les plus abondantes dans les tissus végétaux. Leur activité antioxydante est principalement attribuée à la facilité de donation d'atomes d'hydrogène depuis les groupements phénoliques, stabilisée par délocalisation électronique dans le système  $\pi$  aromatique étendu.

### 1.5.2. Les stilbènes

Les stilbènes constituent une classe de polyphénols caractérisés par un squelette C6–C2–C6, formé de deux cycles aromatiques phényliques reliés par une double liaison éthylénique (pont styrène), pouvant adopter les isomères *cis* (Z) ou *trans* (E). Leur biosynthèse emprunte la voie des phénylpropanoïdes jusqu'au niveau de la 4-coumaroyl-CoA, avant de diverger vers la voie de la stilbène synthase (STS) enzyme clé de la famille des polykétide synthases qui condense trois unités malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour former le resvératrol, précurseur de la majorité des stilbènes végétaux (Rivière *et al.*, 2012).

Bien que les stilbènes soient quantitativement moins abondants chez *T. vulgaris* que les acides phénoliques et les flavonoïdes, leur présence a été rapportée dans plusieurs études phytochimiques (Li *et al.*, 2020). Ils s'accumulent préférentiellement dans les feuilles, les racines et les tiges, souvent en réponse à des stress. À ce titre, les stilbènes sont classiquement définis comme des phytoalexines composés antimicrobiens produits de novo en réponse à des agressions biotiques ou abiotiques ce qui souligne leur rôle défensif primordial (Jeande *et al.*, 2010).

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) est le stilbène de référence le mieux caractérisé biologiquement, bien que sa présence chez *T. vulgaris* soit modeste par rapport aux Vitaceae (vigne). Ses propriétés biologiques incluent : (1) une puissante activité antioxydante par neutralisation des ROS (radicaux hydroxyles, superoxydes, peroxy-nitrite) et inhibition des enzymes oxydantes (NADPH oxydase, xanthine oxydase) ; (2) une activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives, par perturbation

membranaire et inhibition de la synthèse de la paroi ; (3) des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de NF- $\kappa$ B et de la COX-2 ; et (4) une activité anticancéreuse par induction de l'apoptose et blocage du cycle cellulaire (Compean & Ynalvez, 2014 ; Rivière et *al.*, 2012).

### 1.5.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent l'une des classes de métabolites secondaires les plus diversifiées et les plus abondantes du règne végétal, avec plus de 10 000 structures identifiées à ce jour (Mutha et *al.*, 2021). Chez *Thymus vulgaris*, ils constituent, avec les acides phénoliques, la fraction polyphénolique dominante des extraits polaires. Leur squelette carboné de base est un noyau flavane (2-phénylbenzopyrane), structuré autour de deux cycles aromatiques A et B reliés par un hétérocycle oxygéné C, selon la configuration C6–C3–C6. Des variations dans le degré d'oxydation du cycle C, le nombre et la position des substituants (hydroxyles, méthoxyles, glycosides) permettent de distinguer plusieurs sous-classes (Górniak et *al.*, 2019).

Chez *T. vulgaris*, les études phytochimiques par HPLC-DAD-MS/MS ont permis d'identifier et de quantifier les principales sous-classes de flavonoïdes suivantes (Jain & Choudhary, 2022 ; Kowalska et *al.*, 2025) :

- **Flavones** : la lutéoline et l'apigénine, ainsi que leurs glucosides (lutéoline-7-glucoside, apigénine-7-glucoside), sont les flavones dominantes de *T. vulgaris*. Deux flavones polyméthoxyés le cirsilineol et la sideritoflavone sont des marqueurs chimiotaxonomiques distinctifs de l'espèce, caractéristiques du genre *Thymus* (Li et *al.*, 2020)
- **Flavonols** : la quercétine, le kaempférol et leurs glycosides (rutine = quercétine-3-O-rutinoside, hyperoside = quercétine-3-O-galactoside, isoquercitrine) sont présents. Ces composés sont hautement hydrophiles du fait de leur glycosylation, ce qui favorise leur extractibilité par des solvants aqueux et hydro alcooliques (Tsao.,2010).
- **Flavanones** : la naringénine et l'ériodictyol ont été rapportés en faibles proportions. Ces composés sont des précurseurs biosynthétiques des flavones et des flavonols (Scalbert et *al.*,2005).

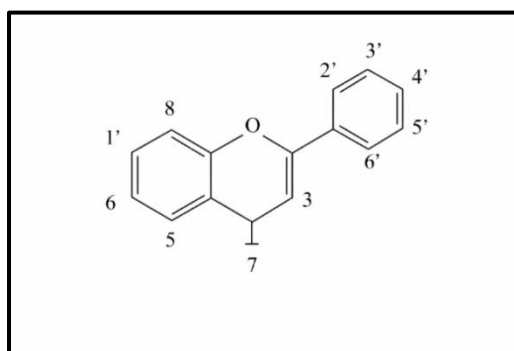
Les flavonoïdes exercent leurs activités biologiques par des mécanismes moléculaires diversifiés.

(1) **Activité antioxydante** : les groupements catéchol (orthodihydroxyle) du cycle B et le groupement 3-OH associé à la double liaison C2=C3 du cycle C sont les déterminants

structuraux de la capacité de donation d'hydrogène et de chélation des métaux. La lutéoline et la quercétine figurent parmi les flavonoïdes dotés de la plus forte activité antioxydante dans la série (Mutha et *al.*, 2021).

(2) **Activité antimicrobienne** : les flavonoïdes inhibent les ADN gyrases et topoisomérases bactériennes, perturbent la membrane cytoplasmique et inhibent la formation de biofilms, réduisant ainsi la virulence bactérienne (Górniak et *al.*, 2019).

(3) **Activité anti-inflammatoire** : la lutéoline inhibe puissamment la COX-2, la LOX-5 et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ) par modulation de la voie NF- $\kappa$ B (Mutha et *al.*, 2021).



**Figure 4** : Structure de base des flavonoïdes (squelette flavane C6–C3–C6, numérotation des positions et cycles A, B et C) (Ward, 2012).

### 1.5.4. Les coumarines

Les coumarines constituent une famille de lactones benzopyroniques (2H-chromen-2-ones) dérivées de la cyclisation intramoléculaire des acides o-hydroxycinnamiques principalement l'acide o-coumarique via une réaction de trans/cis-isomérisation suivie d'une lactonisation. Leur squelette de base est le benzopyran-2-one, sur lequel des substituants hydroxyle, méthoxyle, prényle ou d'autres chaînes peuvent s'ajouter pour générer la grande diversité structurale observée dans la nature (plus de 1 300 coumarines naturelles identifiées) (Abass et *al.*, 2024).

Chez *T. vulgaris*, les coumarines ont été identifiées en proportions variables, principalement dans les feuilles, les racines et les graines. Les composés les plus fréquemment rapportés incluent l'ombelliférone (7-hydroxycoumarine), l'aescutéine (6,7-dihydroxycoumarine) et la scopoétine (6-méthoxy-7-hydroxycoumarine) (Sussman et *al.*, 2020). Ces composés présentent les activités biologiques suivantes :

- **Activité antimicrobienne** : par inhibition de la gyrase bactérienne (topoisomérase II), similairement aux fluoroquinolones, et par perturbation des membranes cellulaires microbiennes. L'aescuétine a montré une activité significative contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Abass et *al.*, 2024).
- **Activité antioxydante** : les coumarines dihydroxylées (catéchol-coumarines) présentent une activité antioxydante significative par donation d'hydrogène et chélation des ions métalliques.
- **Activité anti-inflammatoire** : inhibition de la phospholipase A2, de la COX-2 et modulation de la cascade des cytokines (Sussman et *al.*, 2020).
- **Activité vasodilatatrice et anticoagulante** : propriété de la coumarine elle-même et de ses dérivés dicoumariniques (warfarine-like), exploitée en pharmacologie cardiovasculaire.

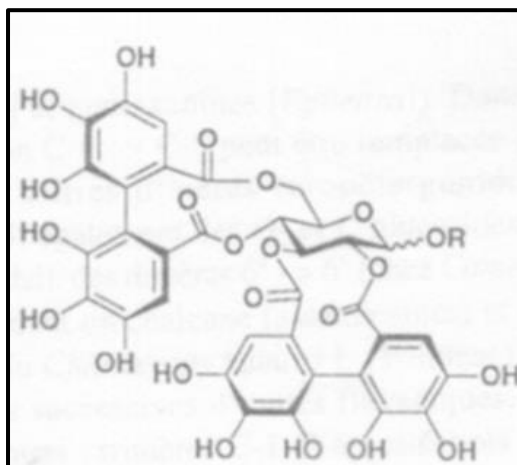
### 1.5.5. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de haute masse moléculaire (500 à 3 000 Da pour les tanins hydrolysables ; jusqu'à 20 000 Da pour les tanins condensés) définis par leur propriété fondamentale de précipiter les protéines – notamment la gélatine et les protéines cutanées – ce qui est à l'origine de l'usage historique de certains végétaux riches en tanins dans le tannage des peaux (Coppo & Marchese, 2014). Chez *T. vulgaris*, les tanins sont principalement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques et subépidermiques des feuilles, des fruits et des écorces, où ils constituent une barrière chimique efficace contre les herbivores et les pathogènes (Dar et *al.*, 2023).

#### 1.5.5.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters d'un polyol central (généralement le glucose) avec des acides phénoliques – acide gallique (gallotanins) ou acide ellagique (ellagitanins) – liés par des liaisons ester hydrolysables en conditions acides, basiques ou enzymatiques (tannases). Cette structure confère leur solubilité dans les solvants polaires et leur extractibilité en milieu aqueux.

Les gallotanins, comme la pentagalloylglucose (PGG), et les ellagitanins, comme la punicalagine ou l'eugénine, sont les représentants les plus actifs biologiquement. Leur mécanisme d'action antimicrobien repose sur : (1) la précipitation des protéines de surface bactériennes par formation de complexes tanin-protéine via des liaisons hydrogène multiples et des interactions hydrophobes ; (2) la chélation des ions métalliques essentiels ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) nécessaires aux métalloenzymes bactériennes ; et (3) la perturbation directe de l'intégrité membranaire (Wu et *al.*, 2020 ; Li et *al.*, 2020).

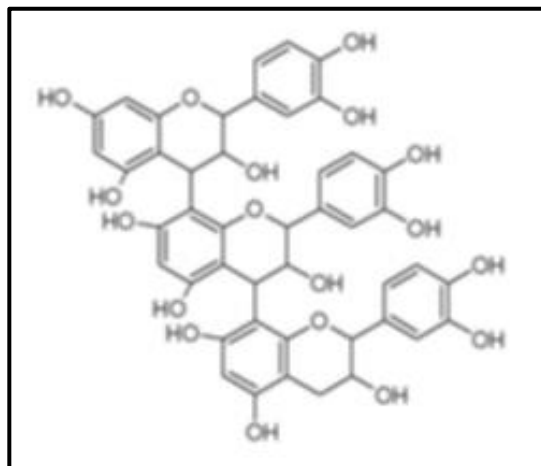


**Figure 5** : Structure des tanins hydrolysables (gallotannins et ellagitannins) (Brunton et al., 1997, 1998).

#### 1.5.5.2. Tanins condensés (proanthocyanidines)

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines (PAC), sont des oligomères et polymères formés par condensation de plusieurs unités flavan-3-ol (catéchine, épicatechine, gallocatéchine) liées par des liaisons carbone-carbone de type C4→C8 (liaisons B) ou C4→C6 (liaisons A), non hydrolysables dans les conditions habituelles. Leur masse moléculaire élevée et leur nature polymère leur confèrent une plus grande résistance chimique et thermique par rapport aux tanins hydrolysables (Scalbert et al., 2010)

Les proanthocyanidines de type A (PAC-A) caractéristiques de certaines espèces comme la canneberge et de type B (PAC-B) les plus répandus diffèrent par le type de liaison intercaténaire. Chez *T. vulgaris*, des proanthocyanidines à base d'épicatechine ont été identifiées (Dar et al., 2023 ; Ahanger et al., 2023). Leurs activités biologiques comprennent une activité antioxydante puissante (neutralisation des ROS et des RNS), une activité anti-inflammatoire (inhibition de NF-κB, réduction de la production d'IL-6 et de TNF-α), une activité antimicrobienne (précipitation de protéines bactériennes de surface) et une activité cardioprotectrice (inhibition de l'oxydation des LDL, amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante) (Manach et al., 2004).



**Figure 6 :** Structure des tanins condensés (proanthocyanidines, unités flavan-3-ol) (Brunton, Grayer *et al.*, 1992, 1997).

#### 1.5.6. Les lignanes

Les lignanes sont des dimères de phénylpropanoïdes formés par couplage oxydatif de deux unités acide cinnamique ou de leurs dérivés, via un pont C8–C8' ( $\beta$ - $\beta'$ ) catalysé par des laccases ou des peroxydases dirigées par des protéines de couplage stéréospécifiques (dirigent proteins). Leur squelette de base le tétrahydrofurane dibenzyle peut subir de nombreuses modifications (méthylation, hydroxylation, glycosylation, lactonisation) pour générer plus de 500 structures naturelles différentes (Durazzo *et al.*, 2019).

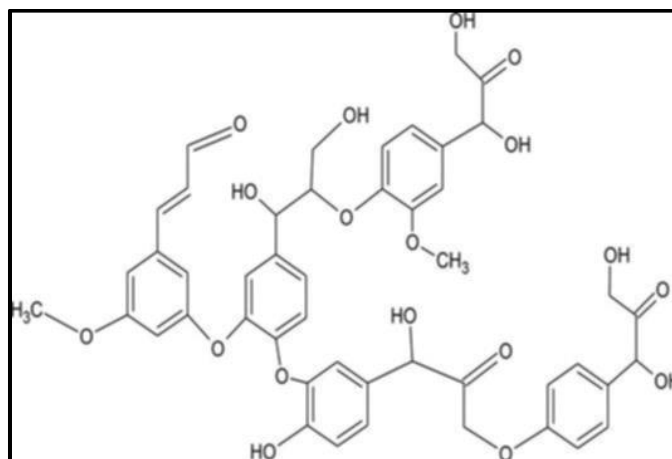
Chez *T. vulgaris*, les lignanes sont présents principalement dans les racines, les tiges et les graines, où ils participent à la protection contre les pathogènes et à la signalisation intra-végétale. Les principaux représentants incluent le sécoisolaricirésinol, le matairésinol et le lariciresinol. Ce sont également des phytoestrogènes : métabolisés en entérodiol et entérolactone par le microbiote intestinal humain, ils présentent une activité estrogénique faible mais biologiquement significative, avec des implications potentielles dans la prévention des cancers hormonodépendants et des maladies cardiovasculaires. Leurs activités antioxydante et antimicrobienne ont également été documentées (Philava *et al.*, 2018 ; Durazzo *et al.*, 2019).

### 1.5.7. La lignine

La lignine est un polymère phénolique tridimensionnel, ramifié et amorphe, constituant après la cellulose le deuxième biopolymère terrestre le plus abondant. Représentant 15 à 30 % de la biomasse végétale ligneuse, elle est le composant structural principal de la paroi cellulaire secondaire des tissus lignifiés (xylème, sclérenchyme, fibres). Sa biosynthèse implique la polymérisation radicalaire de trois alcools cinnamiques précurseurs l'alcool p-coumarylique (monolignol H), l'alcool coniférylique (monolignol G) et l'alcool sinapylique (monolignol S) en proportions variables selon l'espèce, l'organe et le stade de développement (Hopkins, 2003 ; Bagniewska-Zadworna et *al.*, 2014).

La polymérisation de ces monolignols génère des liaisons interunités de types variés ( $\beta$ -O-4',  $\beta$ -5',  $\beta$ - $\beta$ ', 5-5', 4-O-5'), créant une macrostructure en réseau tridimensionnel de haute masse moléculaire (jusqu'à plusieurs centaines de kDa) et de très grande stabilité chimique. Cette architecture moléculaire confère à la lignine des fonctions biologiques essentielles : (1) **rigidité mécanique** permettant la croissance verticale et le transport de l'eau sous tension dans le xylème ; (2) **imperméabilité** constituant une barrière hydrophobe dans l'endoderme (bande de Caspary) et les vaisseaux conducteurs ; (3) **résistance aux pathogènes** par constitution d'une barrière physique infranchissable pour la plupart des hydrolases microbiennes, et par libération de fragments phénoliques toxiques lors de la dégradation partielle de la paroi (Hopkins, 2003).

Bien que la lignine ne soit pas un métabolite secondaire au sens strictement fonctionnel-adaptatif du terme, sa composition en monomères phénoliques et sa localisation pariétale la positionnent à l'interface entre le métabolisme structural et la défense chimique des végétaux. Des fragments oligomériques de lignine (lignine-dérivés) libérés lors du remodelage de la paroi cellulaire présentent des activités antioxydante et antimicrobienne documentées (Bagniewska-Zadworna et *al.*, 2014).



**Figure 7 :** Structure chimique schématique de la lignine (monolignols H, G, S et principales liaisons interunités) (Laurichesse & Avérous, 2014).

### 1.6. Rôles et fonctions biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques terme qui englobe l'ensemble des classes décrites dans les sections précédentes exercent des fonctions biologiques multiples et interconnectées, tant chez les végétaux qui les produisent que chez les organismes qui les consomment. Leur importance dans les deux contextes justifie une analyse distincte.

#### 1.6.1. Fonctions biologiques chez les végétaux

Chez les plantes, les composés phénoliques occupent des rôles fonctionnels qui peuvent être classés en deux grandes catégories :

##### A. Fonctions constitutives (permanentes) :

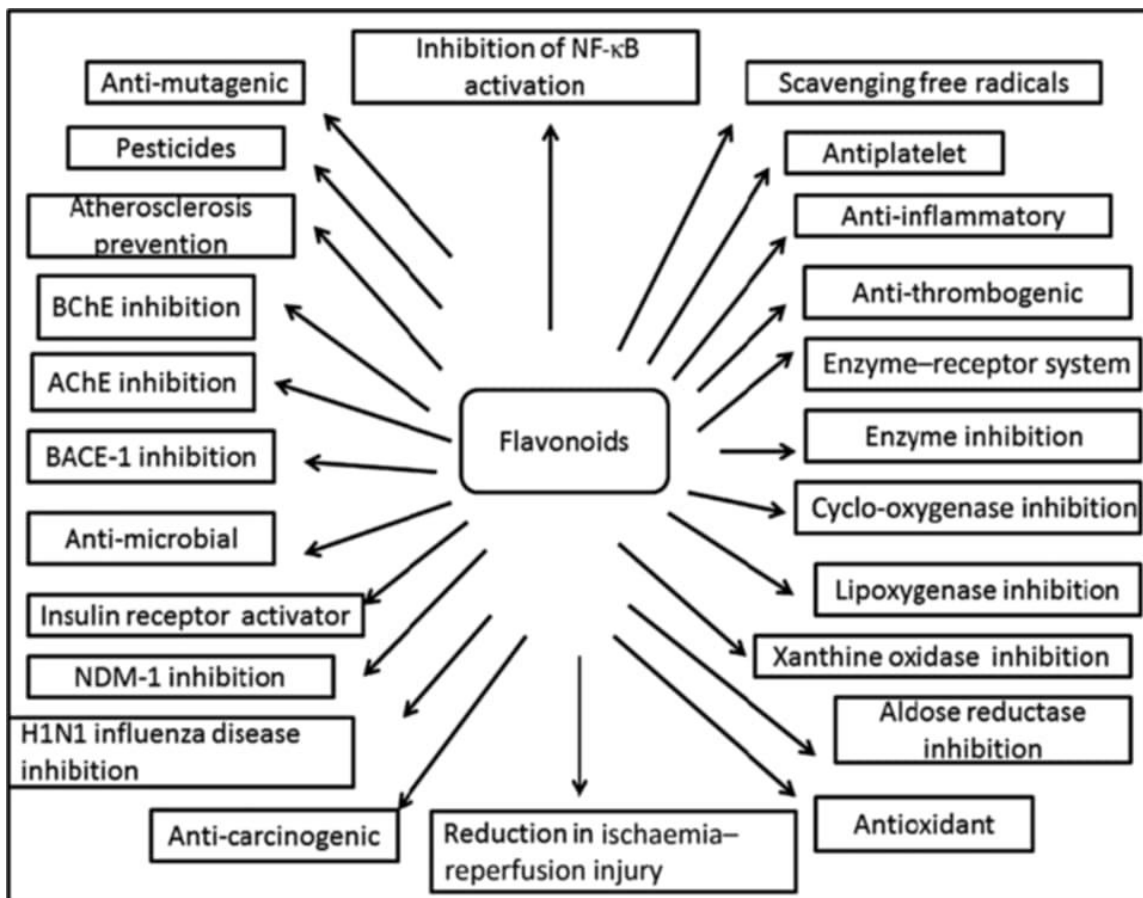
- **Pigmentation et signalisation :** les anthocyanes (sous-classe des flavonoïdes) confèrent les couleurs rouge, violette et bleue aux fleurs et aux fruits, favorisant l'attraction des pollinisateurs et des disperseurs de graines. Les flavonols (quercétine, kaempférol) absorbent les UV-B et protègent les chloroplastes des dommages photo-oxydatifs.
- **Architecture de la paroi cellulaire :** la lignine confère rigidité et imperméabilité aux tissus conducteurs et de soutien.
- **Régulation de la croissance :** les phénols peuvent moduler l'activité des auxines (notamment l'AIA) et intervenir dans la rhizogenèse, la germination et la maturation des fruits.

### *B. Fonctions inductibles (réponse aux stress) :*

- **Phytoalexines et phytoanticipines** : les stilbènes (resvératrol) et certains flavonoïdes sont produits de novo en réponse aux éliciteurs pathogènes, limitant la propagation des agents infectieux.
- **Allélopathie** : certains acides phénoliques (acide caféique, acide férulique) exsudés dans la rhizosphère inhibent la germination et la croissance d'espèces végétales compétitrices, jouant un rôle dans les interactions écologiques interspécifiques.
- **Protection contre le stress oxydatif** : en tant qu'antioxydants non enzymatiques, les polyphénols complètent l'arsenal enzymatique (SOD, CAT, APX) en neutralisant les ROS générés lors des stress biochimiques (Huang et al., 2010 ; Li et al., 2020).

### *1.6.2. Propriétés biologiques d'intérêt chez l'être humain*

Après ingestion, les composés phénoliques subissent une biotransformation complexe impliquant les enzymes digestives, le microbiote intestinal et le métabolisme hépatique (phase I et II), générant une myriade de métabolites circulants dotés de propriétés biologiques propres. Les principales activités pharmacologiques documentées sont les suivantes :



**Figure 8 :** Représentation cumulative des rôles des flavonoïdes en santé humaine et en agriculture (BChE, AChE) (Wink et al ,2004).

- **Activité antioxydante :** neutralisation des ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $ONOO^-$ ,  $H_2O_2$ ) par donation d'atomes d'hydrogène, réduction par transfert monoélectronique et chélation des métaux redox-actifs ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ). L'indice ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et le test DPPH permettent de quantifier cette propriété. L'apport alimentaire en polyphénols est associé à une réduction du stress oxydatif systémique et des dommages oxydatifs à l'ADN (Huang et al., 2010).

- **Activité anti-inflammatoire :** inhibition de la COX-2, de la LOX-5, de la phospholipase A2 et de la production de prostaglandines et leucotriènes. Modulation des voies de signalisation NF-κB et MAPK, réduisant la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α). Ces effets sont associés à une réduction du risque de maladies inflammatoires chroniques

(maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, maladies neurodégénératives) (Mutha et *al.*, 2021 ; De Rossi et *al.*, 2025).

- **Activité antibactérienne** : elle repose sur plusieurs mécanismes, notamment la perturbation des membranes bactériennes, l'inhibition de la gyrase bactérienne ainsi que l'inhibition de la formation des biofilms. Des effets synergiques avec les antibiotiques conventionnels ont également été rapportés, suggérant un intérêt potentiel dans la lutte contre la résistance bactérienne (Górniak et *al.*, 2019).

- **Protection cardiovasculaire** : inhibition de l'oxydation des LDL, amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante (via activation de la eNOS et production de NO), réduction de l'agrégation plaquettaire et des propriétés anticoagulantes. Corrélation épidémiologique avec la réduction de l'incidence des maladies coronariennes (Li et *al.*, 2020).

- **Activité anticancéreuse** : induction de l'apoptose des cellules tumorales (activation des caspases 3, 7, 9 ; régulation positive de Bax/Bcl-2), inhibition de l'angiogenèse tumorale (inhibition du VEGF), arrêt du cycle cellulaire en phases G1 ou G2/M, et inhibition de la migration et de l'invasion cellulaires. Des études épidémiologiques suggèrent une corrélation inverse entre la consommation de polyphénols et l'incidence de certains cancers (côlon, sein, prostate) (Huang et *al.*, 2010 ; De Rossi et *al.*, 2025).

- **Neuroprotection** : les polyphénols traversent partiellement la barrière hémato-encéphalique et exercent des effets neuroprotecteurs par réduction du stress oxydatif neuronal, modulation de la neuroinflammation et amélioration de la plasticité synaptique. Des effets bénéfiques dans des modèles de maladies d'Alzheimer, Parkinson et d'accidents vasculaires cérébraux ont été rapportés (Mutha et *al.*, 2021).

Il convient de souligner que la biodisponibilité des polyphénols est un facteur critique déterminant leur efficacité *in vivo*. Elle est influencée par la structure chimique (glycosylation, méthylation, polymérisation), la matrice alimentaire, la composition du microbiote intestinal, les variations génétiques interindividuelles (polymorphismes des enzymes de métabolisation) et les interactions médicaments-polyphénols. La traduction des données *in vitro* en effets physiologiques cliniquement pertinents reste un enjeu scientifique majeur du domaine (Huang et *al.*, 2010 ; De Rossi et *al.*, 2025).

### 1.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques : contexte et enjeux

La résistance aux antimicrobiens (RAM) constitue l'une des priorités de l'agenda sanitaire mondial. L'OMS a classé plusieurs agents pathogènes résistants dans la catégorie « priorité critique », notamment *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux carbapénèmes et les entérobactéries productrices de BLSE (WHO, 2022). Cette résistance repose sur des mécanismes moléculaires diversifiés : inactivation enzymatique des antibiotiques (bêta-lactamases, aminoglycoside-transférases), modification des cibles (PBPs, ribosomes), surexpression de pompes d'efflux multidrogues et modification de la perméabilité membranaire (Laxminarayan et al., 2013).

Les quatre souches bactériennes retenues dans cette étude illustrent cette problématique : *P. aeruginosa* et *E. coli* représentent les pathogènes Gram-négatifs à résistance intrinsèque et acquise, tandis que *S. aureus* illustre la problématique des cocci à Gram-positif résistants (SARM) et *B. cereus* est associé aux toxi-infections alimentaires et aux infections opportunistes. La recherche d'agents naturels actifs sur ces souches de référence revêt donc une pertinence clinique et pharmaceutique réelle.

## **Matériels et Méthodes**

## Matériels et Méthodes

### 2.1. Cadre expérimental

Les travaux expérimentaux ont été conduits au sein de deux laboratoires du Département des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou : le laboratoire de physicochimie, pour les analyses phytochimiques, et le laboratoire de microbiologie, pour les tests d'activité antibactérienne. Les expériences ont été réalisées au cours du deuxième semestre de l'année universitaire 2025-2026.

### 2.2. Matériel végétal

#### 2.2.1. Récolte et identification botanique

Des feuilles de *Thymus vulgaris* L. ont été récoltées en février 2026 dans la localité d'Oued Aïssi, wilaya de Tizi Ouzou (Algérie ; 36°42' N, 4°06' E ; altitude approximative : 280 m), au stade végétatif de pré-floraison. L'identification botanique de l'espèce a été confirmée par un botaniste du département.

#### 2.2.2. Préparation du matériel végétal

Après récolte, les feuilles ont été soigneusement nettoyées à l'eau distillée pour éliminer les impuretés (terre, poussières, insectes), puis séchées à l'ombre et à température ambiante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) pendant 15 jours, à l'abri de la lumière directe et de l'humidité, afin de préserver l'intégrité des composés bioactifs thermolabiles et photosensibles. Les tiges et pétioles ont été soigneusement écartés pour ne conserver que le limbe foliaire. Une fois le séchage complet, les feuilles ont été réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été tamisée (tamis 500  $\mu\text{m}$ ) pour assurer une granulométrie homogène, puis conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'à utilisation.

### 2.3. Matériel microbiologique

#### 2.3.1. Souches bactériennes

Quatre souches bactériennes de référence certifiées ont été utilisées dans cette étude, obtenues auprès du laboratoire commun de microbiologie de la faculté (Tableau 3).

**Tableau 3** : Souches bactériennes de référence utilisées dans l'étude.

Espèce bactérienne	Souche ATCC	Gram	Pathologies associées
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25923	Négatif	Infections urinaires, diarrhées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négatif	Infections nosocomiales, mucoviscidose
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Positif	Toxi-infections alimentaires
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	Positif	Infections cutanées, septicémies

Note : Les souches ont été conservées à -20°C en bouillon nutritif additionné de 20% de glycérol (v/v). Avant utilisation, une revivification a été effectuée par repiquage sur gélose nutritive à 37°C pendant 24 heures.

#### 2.3.2. Milieux de culture et réactifs

Les milieux de culture suivants ont été utilisés : gélose nutritive (GN) pour la revivification et le maintien des souches ; gélose Mueller-Hinton (MH) pour les tests d'antibiogramme et de diffusion en disques, conformément aux recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Les milieux ont été préparés selon les instructions des fabricants, stérilisés à 121°C pendant 15 minutes (autoclave) et coulés en boîtes de Pétri (20 mL/boîte) dans des conditions aseptiques. Les réactifs utilisés pour le dosage des polyphénols sont : réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich) et acide gallique (Sigma-Aldrich, pureté ≥ 99%) utilisé comme standard externe.

### 2.4. Méthodes

#### 2.4.1. Préparation de l'extrait aqueux

Une quantité de Vingt grammes (20 g) de poudre de feuilles de *T. vulgaris* ont été mis en macération dans 200 mL d'eau distillée stérile (rapport solide/liquide : 1/10, m/v) dans un récipient en verre borosilicaté, sous agitation magnétique continue à température ambiante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), à l'abri de la lumière, pendant 24 heures. Cette durée de macération a été choisie sur la base des données de la littérature indiquant une extraction optimale des composés phénoliques hydrosolubles pour une durée de 12 à 48 heures (Blainski et al., 2013).

À l'issue de la macération, le mélange a été filtré en deux étapes successives : (1) filtration grossière sur toile de nylon (500  $\mu\text{m}$ ) pour éliminer les débris végétaux macroscopiques, puis (2) filtration fine sur papier filtre Whatman n°1 (porosité 11  $\mu\text{m}$ ) jusqu'à obtention d'un filtrat clair et homogène. Le filtrat a été évaporé à sec dans une étuve à  $40^\circ\text{C}$  pour prévenir la dégradation des composés thermolabiles. Le résidu sec (extrait brut) a été pesé pour calculer le taux d'extraction (rendement, %) selon la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{masse de l'extrait sec} / \text{masse de poudre initiale}) \times 100.$$

L'extrait sec a été reconstitué dans l'eau distillée stérile aux concentrations souhaitées avant chaque utilisation.

#### 2.4.2. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, standardisée par Singleton & Rossi (1965) et adaptée par Blainski et al. (2013). Le réactif de Folin-Ciocalteu, composé d'hétéropolyanions d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique, est réduit par les groupements phénoliques en présence d'un milieu alcalin, formant un complexe de coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 760 nm, est directement proportionnelle à la concentration en polyphénols (loi de Beer-Lambert).

**Protocole :** Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'extrait préparé à 40  $\mu\text{g/mL}$  ont été mélangés avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au 1/10 dans l'eau distillée. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante (pour permettre l'oxydation initiale des groupements phénoliques), 800  $\mu\text{L}$  de solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7,5 % (m/v) ont été ajoutés pour alcaliniser le milieu et stabiliser le complexe coloré. Le mélange réactionnel a été

incubé à l'obscurité pendant 45 minutes à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 760 nm sur un spectrophotomètre UV-visible. Un blanc réactif a été préparé en remplaçant l'extrait par 200 µL d'eau distillée, soumis au même protocole. Les mesures ont été réalisées en triplicats.

**Courbe d'étalonnage :** Une gamme de solutions standard d'acide gallique de 25 à 200 µg/mL a été préparée dans l'eau distillée et traitée selon le même protocole. La courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration) a été construite et la régression linéaire calculée. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

### *2.4.3. Évaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose*

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon la technique de Kirby-Bauer modifiée (CLSI, 2022 ; Compaoré et *al.*, 2025). Cette méthode qualitative et semi-quantitative permet d'évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un extrait végétal par mesure de la zone d'inhibition de croissance autour du disque imprégné.

**Préparation de l'inoculum :** À partir de cultures fraîches de 24 heures sur gélose nutritive, 2 à 3 colonies bien isolées de chaque souche ont été prélevées et suspendues dans 9 mL d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%). La turbidité de la suspension a été ajustée à 0,5 McFarland ( $DO_{620} = 0,08-0,10$ ), correspondant approximativement à une densité de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

**Ensemencement et dépôt des disques :** Les boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton solidifiée ont été ensemencées par écouvillonnage en trois directions à 60°, selon la technique standard, en imbibant un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et en le passant uniformément sur toute la surface de la gélose. Cinq disques de papier Whatman n°1 stériles (diamètre 6 mm) ont été déposés à la surface de chaque boîte en respectant un espacement suffisant ( $\geq 24$  mm entre les centres) : trois disques imprégnés de 10 µL d'extrait aqueux à 250 mg/mL, un disque témoin négatif imprégné de 10 µL d'eau distillée stérile, et un disque témoin positif (gentamicine, 10 µg/disque).

**Incubation et lecture :** Après 30 minutes de pré-diffusion à température ambiante, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition (ZI), incluant le diamètre du disque (6 mm), ont été mesurés avec un pied à coulisse digital au millimètre près. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. L'activité antibactérienne a été interprétée

selon l'échelle de Ponce et al. (2003) :  $ZI < 8$  mm : inactif ; 9-14 mm : modérément actif ; 15-19 mm : actif ;  $\geq 20$  mm : très actif.

#### 2.4.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber toute croissance macroscopiquement visible d'un micro-organisme dans des conditions standardisées (Wiegand et *al.*, 2008). Dans cette étude, la CMI a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose en gradient de concentrations, adaptée à la nature semi-polaire de l'extrait aqueux.

Une série de dilutions de l'extrait aqueux en eau distillée stérile a été préparée, couvrant une plage de concentrations de 1 à 125 mg/mL. Des disques imprégnés de 10  $\mu$ L de chaque dilution ont été déposés sur des boîtes de Pétri de Mueller-Hinton préalablement ensemencées. Après 30 minutes de diffusion et incubation à 37°C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. La CMI correspond à la plus faible concentration pour laquelle une zone d'inhibition nette ( $\geq 1$  mm autour du disque) est observée.

## **Résultats et discussion**

### Résultats et discussion

Ce chapitre présente et analyse les résultats obtenus lors de l'évaluation phytochimique et microbiologique de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* L. récoltées dans la région de Tizi Ouzou. Les résultats sont systématiquement confrontés aux données disponibles dans la littérature afin d'en apprécier la pertinence scientifique et la valeur comparative.

#### 3.1. Rendement d'extraction

L'extraction aqueuse des feuilles de *Thymus vulgaris* a permis d'obtenir un extrait sec après évaporation à 40 °C. La masse de l'extrait obtenu a été utilisée pour calculer le rendement d'extraction selon la formule indiquée.

Le rendement obtenu est de 10 %. Ce résultat montre que la macération aqueuse permet d'extraire une quantité modérée de composés hydrosolubles présents dans la plante (Dapkevicius et *al.*, 2002 ; Hossain et *al.*, 2013).

Ce rendement est cohérent avec les données de la littérature rapportant des rendements d'extraction aqueuse du thym variant selon l'origine de la plante, les conditions de séchage et les paramètres d'extraction (Hossain et *al.*, 2013 ; Nickavar et *al.*, 2005).

#### 3.2. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

##### 3.2.1. Validation de la courbe d'étalonnage

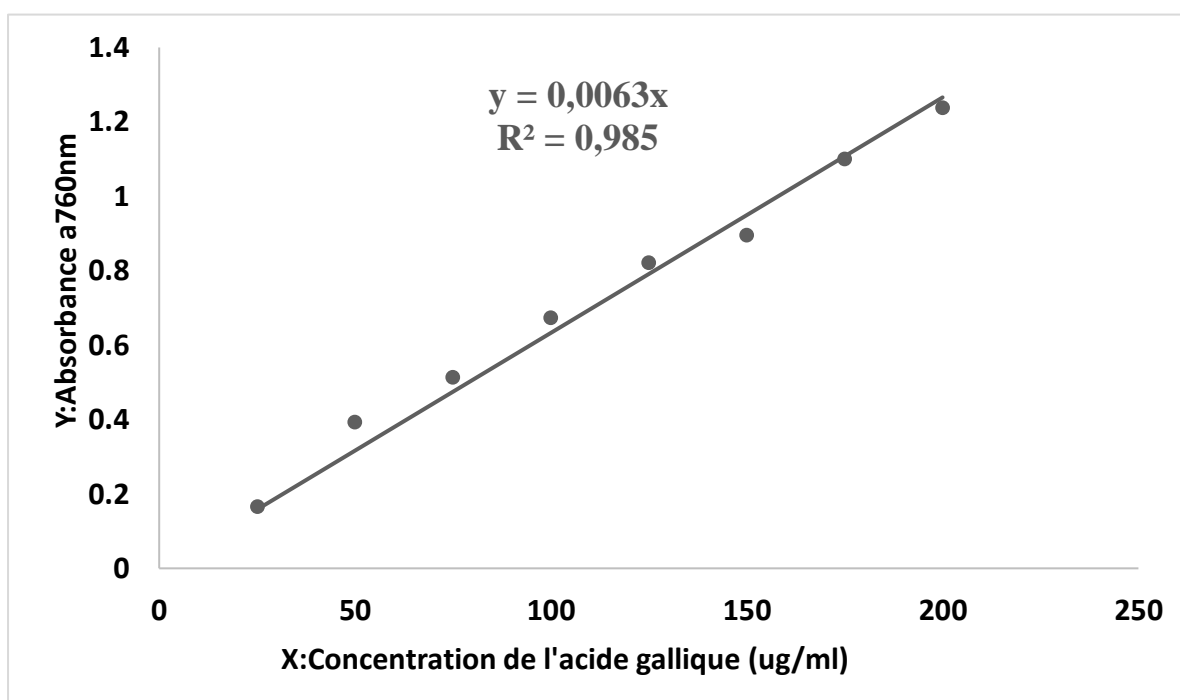
La quantification des polyphénols totaux repose sur une courbe d'étalonnage externe établie avec l'acide gallique comme composé phénolique de référence substance pure, commercialement disponible, chimiquement stable et réagissant quantitativement avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les mesures d'absorbance effectuées à 760 nm sur la gamme de concentrations de 25 à 200 µg/mL présentent une relation linéaire hautement significative, décrite par l'équation de régression :

$$Y = 0,006x + 0,0401 (R^2 = 0,9932)$$

- ✓ Où Y représente l'absorbance à 760 nm
- ✓ X la concentration en acide gallique (µg/mL)

Le coefficient de détermination  $R^2 = 0,9932$  est supérieur au seuil de validation analytique de 0,99 confirmant l'excellente adéquation linéaire du modèle dans la gamme testée. L'ordonnée à l'origine (0,0401) est faible et proche de zéro, indiquant l'absence d'absorbance parasite significative imputable au réactif seul. La pente (0,006 unité d'absorbance par µg/mL)

définit la sensibilité analytique de la méthode dans ces conditions opératoires. La conformité de ces paramètres aux critères de validation confirme que la méthode de Folin-Ciocalteu, telle qu'appliquée dans cette étude, est linéaire, précise et apte à la quantification des polyphénols totaux dans les gammes de concentrations étudiées (Singleton & Rossi, 1965 ; Cicco & Lattanzio, 2011).



**Figure 9 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### 3.2.2. Teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux

L'analyse spectrophotométrique de l'extrait aqueux des feuilles de *T. vulgaris* a révélé une teneur en polyphénols totaux de  $110 \pm 0,0036$  mg EAG/g ES. Cette valeur, obtenue par interpolation sur la droite d'étalonnage, atteste d'une richesse appréciable en composés phénoliques hydrosolubles pour un extrait aqueux de cette espèce, et confirme le statut de *T. vulgaris* comme plante médicinale à forte densité phénolique.

**Tableau 4** : Synthèse comparative des données issues de la littérature et des résultats de la présente étude (Kowalska *et al.*, 2025 ; Nateqi *et al.*, 2018 ; Yakhlef *et al.*, 2011 ; Mehmood *et al.*, 2015 ; présente étude, 2026).

Référence	Solvant	TPC (mg EAG/g)	Origine	Méthode
Présente étude (2026)	Eau distillée	110 ± 0,0036	Tizi Ouzou (Algérie)	Macération, FC
Yakhlef <i>et al.</i> (2011)	Eau	67,63 ± 5,73	Algérie	Macération, FC
Yakhlef <i>et al.</i> (2011)	Méthanol	165,45 ± 32,14	Algérie	Macération, FC
Yakhlef <i>et al.</i> (2011)	Dichlorométhane	218,09 ± 38,37	Algérie	Macération, FC
Nateqi <i>et al.</i> (2018)	Eau	54,21	Maroc	Macération, FC
Nateqi <i>et al.</i> (2018)	Méthanol	70,55	Maroc	Macération, FC
Nateqi <i>et al.</i> (2018)	Hydroéthanol	68,34	Maroc	Macération, FC
Mehmood <i>et al.</i> (2015)	Méthanol	190,22 ± 0,29	Pakistan	Macération, FC
Kowalska <i>et al.</i> (2025)	Hydroéthanol 70%	179,57	Pologne	Extraction assistée, FC

La confrontation avec les données bibliographiques (Tableau 4) révèle que la valeur obtenue dans la présente étude (110 mg EAG/g ES) est notablement supérieure à tous les extraits aqueux de *T. vulgaris* rapportés dans la littérature 67,63 mg EAG/g (Yakhlef *et al.*, 2011) et 54,21 mg EAG/g (Nateqi *et al.*, 2018) et dépasse même certains extraits

méthanoliques (70,55 mg EAG/g, Nateqi et *al.*, 2018). Cette observation n'est pas anodine et mérite une analyse approfondie.

Trois facteurs principaux peuvent expliquer cette valeur élevée pour un extrait aqueux :

**(i) Origine géographique et conditions édaphoclimatiques :** la région de Tizi Ouzou, caractérisée par un étage bioclimatique subhumide d'altitude avec une pluviométrie hivernale significative et une irradiation estivale intense, constitue un environnement propice à la stimulation de la biosynthèse des polyphénols via les voies de signalisation photo-oxydative et de stress hydrique. Plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre l'intensité du stress UV reçu par les plantes et les teneurs en flavonoïdes et en acides phénoliques (Lattanzio et *al.*, 2006). Le chémotype présent à Tizi Ouzou non déterminé dans la présente étude, lacune qu'il conviendrait de combler peut également différer biochimiquement des populations du Maroc et de Pologne.

**(ii) Stade phénologique :** la récolte effectuée en février 2026, au stade végétatif pré-floraison, correspond à une phase d'accumulation maximale des métabolites secondaires dans les feuilles, avant leur mobilisation pour la floraison. Plusieurs travaux ont montré que les teneurs en polyphénols totaux de *T. vulgaris* atteignent leur maximum en période végétative et diminuent significativement lors de la floraison et de la fructification (Mancini et *al.*, 2015).

**(iii) Conditions d'extraction optimisées :** la macération sous agitation magnétique continue pendant 24 heures optimise le coefficient de transfert de masse en maintenant un gradient de concentration maximal entre la poudre végétale et le solvant. Cette agitation continue est plus efficace que l'agitation intermittente employée dans certaines études comparatives, pouvant expliquer un rendement d'extraction phénolique supérieur dans des conditions de solvant identiques (Azmir et *al.*, 2013).

Néanmoins, la valeur reste logiquement inférieure aux extraits organiques : 165,45 mg EAG/g (méthanol, Yakhlef et *al.*, 2011), 179,57 mg EAG/g (hydroéthanol 70%, Kowalska et *al.*, 2025) et 218,09 mg EAG/g (dichlorométhane, Yakhlef et *al.*, 2011). Cette hiérarchie s'explique par la polarité respective des solvants vis-à-vis du spectre de composés phénoliques de *T. vulgaris*. L'eau extrait sélectivement les glycosides flavonoïdiques hautement hydrophiles (rutine, hyperoside, vitexine, apigénine-7-glucoside) et les acides phénoliques sous forme ionisée, mais est inefficace pour les aglycones de faible polarité (lutéoline, apigénine libres), les diterpènes phénoliques lipophiles (acide carnosique) et les formes esterifiées d'acides phénoliques (Blainski et *al.*, 2013). Les mélanges hydroalcooliques offrent un compromis de

polarité permettant de couvrir l'intégralité du spectre polyphénolique, ce qui justifie leurs rendements supérieurs.

Il convient par ailleurs de souligner une limite méthodologique inhérente à la méthode de Folin-Ciocalteu : sa non-spécificité vis-à-vis des composés phénoliques stricts. D'autres composés réducteurs présents dans les extraits aqueux de *T. vulgaris* notamment l'acide ascorbique (vitamine C), les sucres réducteurs et certains acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine) peuvent réduire le réactif et conduire à une surestimation du contenu phénolique réel. Cet effet est potentiellement significatif pour les extraits aqueux riches en vitamine C, mais reste généralement considéré comme marginal dans les conditions standardisées du protocole (Cicco & Lattanzio, 2011). La caractérisation individuelle des composés phénoliques par HPLC-DAD-MS/MS constituerait une étape indispensable pour affiner et valider ces résultats quantitatifs globaux.

### 3.3. Activité antibactérienne par diffusion sur gélose

#### 3.3.1. Résultats des zones d'inhibition

Les résultats de la méthode de diffusion en disques sur gélose Mueller-Hinton sont présentés dans le Tableau 5. À la concentration testée de 250 mg/mL (équivalent à 2 500 µg/disque après imprégnation de 10 µL), l'extrait aqueux de *T. vulgaris* a exercé une activité inhibitrice sur l'ensemble des quatre souches bactériennes testées, avec des diamètres de zones d'inhibition (ZI) compris entre  $12.00 \pm 1,00$  et  $14.23 \pm 0,68$  mm. Le témoin négatif (eau distillée stérile) n'a produit aucune zone d'inhibition quelle que soit la souche, confirmant que l'activité observée est bien attribuable aux composés bioactifs de l'extrait et non au solvant.

**Tableau 5** : Diamètres des zones d'inhibition (ZI, mm) de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* à 250 mg/mL et de la gentamicine (10 µg/disque) vis-à-vis des quatre souches bactériennes de référence.

Souche bactérienne	Gram	ZI extrait (mm) ± SD	ZI gentamicine (mm)	Activité (Ponce et al., 2003)
<i>E. coli</i> ATCC 25923	–	12,00 ± 1,00	17	Modérée
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	14,23 ± 0,68	18	Modérée
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	+	14,17 ± 0,76	28	Modérée
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	12,20 ± 0,72	24	Modérée

SD : écart-type (n = 3 réplicats indépendants) ; ZI : zone d'inhibition (diamètre disque inclus = 6 mm) : négatif, + : positif.

### 3.3.2. Discussion des résultats de diffusion

Selon la classification de Ponce et al. (2003), les zones d'inhibition de 12 à 14 mm correspondent à une activité antibactérienne modérée (seuil 9–14 mm). Bien que significativement inférieures à celles de la gentamicine antibiotique aminoglycoside de référence agissant par inhibition irréversible de la synthèse protéique ribosomale (blocage de la sous-unité 30S et induction de la lecture erronée de l'ARNm) ces zones d'inhibition confirment la bioactivité intrinsèque des composés phénoliques hydrosolubles de *T. vulgaris* et leur capacité à interférer avec la croissance bactérienne dans les conditions expérimentales testées.

#### Analyse de la sensibilité de *Bacillus cereus* (ZI = 14,17 mm ; souche Gram-positif) :

*B. cereus* présente la sensibilité la plus élevée parmi les souches Gram-positives testées. Cette observation est cohérente avec la structure de la paroi cellulaire de cette bactérie sporulante : l'absence de membrane externe lipopolysaccharidique (caractéristique des Gram-positifs) réduit considérablement la barrière de perméabilité primaire contre les agents antimicrobiens polaires. La paroi en peptidoglycane épaisse (15–80 nm) des Gram-positifs, bien que constituant une barrière physique, est traversée par de nombreux composés phénoliques de faible poids moléculaire, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes glycosylés, dont

la diffusion vers la membrane cytoplasmique est facilitée par leur nature hydrophile (Coppo & Marchese, 2014). L'acide rosmarinique et l'acide caféique, présents dans l'extrait aqueux de *T. vulgaris*, sont capables d'interagir avec les protéines de surface de *B. cereus* et de perturber la fluidité membranaire, conduisant à une fuite des constituants intracellulaires essentiels (ions K<sup>+</sup>, ATP, protéines cytoplasmiques) (Li et al., 2020).

### **Analyse de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* (ZI = 14,23 mm ; souche Gram-négative) :**

La sensibilité de *P. aeruginosa* constitue le résultat le plus inattendu et scientifiquement le plus intéressant de cette étude. En effet, *P. aeruginosa* est classé par l'OMS (2022) dans la catégorie « priorité critique » en raison de sa résistance intrinsèque exceptionnelle, attribuée à : (1) une membrane externe à faible perméabilité (haute teneur en LPS et lipide A hyperacylé) ; (2) des porines à faible conductance ionique (OprD, réduites ou absentes chez les souches résistantes) ; (3) des systèmes d'efflux multidrogues à large spectre (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY) capables d'exporter activement de nombreux agents antimicrobiens ; et (4) la production d'enzymes inactivatrices (BLSE, carbapénémases) (Nikaido, 1994 ; WHO, 2022).

L'obtention d'une zone d'inhibition de 14,23 mm suggère que certains composés phénoliques de l'extrait aqueux sont capables de contourner ces mécanismes de résistance. Deux mécanismes sont plausibles : (a) des acides hydroxycinnamiques de faible poids moléculaire (acide caféique, acide rosmarinique) pourraient perturber la structure lipidique de la membrane externe en interagissant avec les lipopolysaccharides, induisant une déstabilisation locale qui facilite leur propre entrée dans la bactérie et celle d'autres composés actifs (Amarti et al., 2011) ; (b) certains polyphénols peuvent inhiber les pompes d'efflux de type RND, réduisant leur capacité à exporter les agents antimicrobiens et restaurant ainsi une sensibilité partielle (Tegos et al., 2002). Ce phénomène, décrit sous le terme d'inhibition des pompes d'efflux (EPIs, Efflux Pump Inhibitors), est une piste de recherche active dans le cadre de la lutte contre la résistance bactérienne.

### **Analyse de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (ZI = 12,20 mm ; souche SARM) :**

La zone d'inhibition modérée obtenue pour *S. aureus* ATCC 43300 (souche SARM) mérite une attention particulière. La résistance à la méticilline, conférée par le gène *mecA* codant pour la PBP2a (protéine liant la pénicilline de faible affinité pour les bêta-lactamines),

n'implique pas de résistance intrinsèque aux composés phénoliques végétaux, dont les mécanismes d'action diffèrent fondamentalement de ceux des antibiotiques bêta-lactamines. Cependant, *S. aureus* ATCC 43300 peut exprimer des mécanismes de résistance additionnels vis-à-vis des agents phénoliques : surexpression de la pompe d'efflux NorA (superfamille MFS), capable d'exporter certains flavonoïdes et acides phénoliques, épaissement adaptatif de la paroi en peptidoglycane, et formation de biofilms réduisant l'accessibilité aux sites d'action intracellulaires (Coppo & Marchese, 2014). La zone d'inhibition de 12,20 mm témoigne néanmoins d'une activité réelle des composés phénoliques aqueux sur cette souche résistante, ce qui revêt une signification clinique potentielle non négligeable dans le contexte de la lutte contre les infections à SARM.

### **Analyse de la sensibilité d'*Escherichia coli* (ZI = 12 mm ; souche Gram-négative) :**

*E. coli* ATCC 25923 présente la sensibilité la plus faible de l'ensemble des souches testées. Bien qu'il s'agisse d'une souche sauvage de référence (sensible aux antibiotiques de première intention), sa résistance relative aux composés phénoliques de l'extrait aqueux s'explique par la combinaison de plusieurs facteurs structuraux : (1) la membrane externe LPS d'*E. coli*, de composition plus régulière que celle de *P. aeruginosa* mais constituant une barrière hydrophobe efficace contre les composés polaires ; et (2) la pompe d'efflux AcrAB-TolC, exprimée constitutivement chez *E. coli* et capable d'exporter activement les acides phénoliques et les flavonoïdes glycosylés hors de la cellule bactérienne, maintenant leur concentration intracellulaire sous le seuil bactériostatique (Laxminarayan et al., 2013).

### **Comparaison avec la littérature :**

Les zones d'inhibition obtenues dans la présente étude (12–14,23 mm) sont cohérentes avec les données rapportées pour des extraits aqueux d'autres Lamiaceae à propriétés antimicrobiennes documentées, notamment *Origanum vulgare* (10–16 mm, Bouyahya et al., 2017) et *Rosmarinus officinalis* (8–13 mm, Boutabia et al., 2016), confirmant le niveau d'activité antibactérienne « modérée » caractéristique des extraits aqueux de cette famille botanique. En revanche, les extraits apolaires et les huiles essentielles de *T. vulgaris* riches en thymol et carvacrol libres produisent des zones d'inhibition de 20 à 64 mm vis-à-vis des mêmes souches (Al-Bayati, 2006 ; Cosentino et al., 1999 ; Dorman & Deans, 2000). Cette différence remarquable s'explique par les propriétés physicochimiques distinctes du thymol et du carvacrol : leur caractère lipophile ( $\log P \approx 3,3$ ) facilite leur partition dans les bicouches lipidiques membranaires et leur accumulation dans les membranes bactériennes à des concentrations

entraînant une désorganisation structurale rapide et irréversible (Dorman & Deans, 2000). Ces phénols volatils ne sont pas extractibles par l'eau pure, ce qui explique l'absence de leur contribution dans le présent extrait aqueux.

L'activité antibactérienne des extraits végétaux polyphénoliques repose généralement sur un effet synergique entre plusieurs classes de composés plutôt que sur l'action isolée d'un seul constituant. Dans l'extrait aqueux de *T. vulgaris*, les acides phénoliques (acide rosmarinique, acide caféique), les flavonoïdes glycosylés (rutine, apigénine-7-glucoside, lutéoline-7-glucoside) et les tanins hydrolysables agissent de concert selon des mécanismes complémentaires : perturbation de l'intégrité membranaire, inhibition d'enzymes métaboliques essentielles (ATPases, topo-isomérases, déshydrogénases), chélation des ions métalliques cofacteurs ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) et inhibition de la formation de biofilms (Lucchini *et al.*, 1990 ; Górnjak *et al.*, 2019). Cette synergie multi-cibles est d'ailleurs considérée comme l'un des avantages majeurs des extraits végétaux complexes par rapport aux antibiotiques à cible unique, car elle rend plus difficile le développement de résistances (Newman & Cragg, 2016).

### 3.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

#### 3.4.1. Résultats des CMI

Les valeurs de CMI de l'extrait aqueux de *T. vulgaris*, déterminées par la méthode de diffusion sur gélose en gradient décroissant de concentrations, sont présentées dans le Tableau 6. Les valeurs sont classées par ordre croissant de sensibilité bactérienne (i.e., par ordre décroissant de CMI).

**Tableau 6** : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des souches bactériennes de référence et classification de l'activité selon *Aligiannis et al. (2001)*.

Souche bactérienne	Gram	CMI (mg/mL)	CMI (µg/mL)	Niveau d'activité (Aligiannis et al., 2001)
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	+	1,25	1 250	Modérée (600–1 500 µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	5	5 000	Faible (> 1 600 µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	8	8 000	Faible (> 1 600 µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25923	–	10	10 000	Faible (> 1 600 µg/mL)

Rappel de la classification : CMI < 500 µg/mL = forte activité ; 600–1 500 µg/mL = modérée ; > 1 600 µg/mL = faible (Aligiannis et al., 2001).

### 3.4.2. Discussion des valeurs de CMI

L'analyse des valeurs de CMI selon la classification d'Aligiannis et al. (2001) révèle que seule la CMI vis-à-vis de *B. cereus* (1 250 µg/mL) atteint le niveau « modéré », tandis que les CMI enregistrées pour les trois autres souches (5 000 à 10 000 µg/mL) caractérisent une activité « faible ». Ces résultats sont en adéquation quantitative avec les zones d'inhibition observées en diffusion sur gélose, confirmant la cohérence et la reproductibilité des deux méthodes d'évaluation utilisées.

#### ***Bacillus cereus* CMI = 1,25 mg/mL (1 250 µg/mL) :**

La CMI la plus basse obtenue vis-à-vis de *B. cereus* corrobore parfaitement les résultats de diffusion sur gélose et confirme la sensibilité accrue de cette espèce aux polyphénols végétaux. Les mécanismes d'action à cette concentration inhibitrice impliquent probablement : (1) une dépolarisation de la membrane cytoplasmique par insertion des acides phénoliques entre les phospholipides membranaires, réduisant la force proton-motrice (PMF) nécessaire à la synthèse d'ATP et au transport actif des nutriments ; (2) une inhibition des ATPases membranaires de type F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ; (3) une précipitation des protéines de surface par les tanins, limitant les échanges membranaires ; et (4) une inhibition de la sporulation par interférence avec les

voies de signalisation Spo0A/σF, réduisant la persistance de la bactérie dans les matrices alimentaires (Coppo & Marchese, 2014 ; Li *et al.*, 2020). Ces résultats ouvrent des perspectives applicatives intéressantes dans le domaine de la bioconservation alimentaire, où *B. cereus* représente un contaminant majeur.

### ***Pseudomonas aeruginosa* CMI = 5 mg/mL (5 000 µg/mL):**

La CMI intermédiaire de *P. aeruginosa* (5 mg/mL), inférieure à celle d'*E. coli* (10 mg/mL), est un résultat paradoxal qui mérite une interprétation rigoureuse. Comme discuté en §3.3.2, ce résultat suggère que la structure de la membrane externe de *P. aeruginosa* quoique hautement imperméable présente des vulnérabilités spécifiques vis-à-vis de certains composés phénoliques à forte concentration. L'acide rosmarinique, en particulier, a été identifié comme capable d'induire la perméabilisation de la membrane externe de bactéries Gram-négatives à des concentrations de l'ordre du mg/mL, vraisemblablement par déplacement des cations divalents (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) stabilisant les ponts ioniques entre les lipopolysaccharides, conduisant à l'autodégradation partielle de la membrane externe et à l'augmentation de sa perméabilité (Petersen & Simmonds, 2003). Ce mécanisme, analogue à celui de l'EDTA utilisé comme sensibilisateur de la membrane externe des Gram-négatifs, pourrait expliquer la sensibilité relative inattendue de *P. aeruginosa* à cet extrait aqueux.

### ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300 CMI = 8 mg/mL (8 000 µg/mL) :**

La CMI de 8 mg/mL pour la souche SARM est supérieure à celle de *B. cereus*, ce qui peut sembler contradictoire avec l'appartenance commune de ces deux espèces aux Gram-positifs. La différence s'explique par les mécanismes de résistance additionnels propres à la souche ATCC 43300 : la surexpression de la pompe d'efflux NorA (protéine MFS/14 hélices transmembranaires), dont le substrat principal est constitué de composés fluoroquinolone-like mais qui présente également une affinité significative pour certains flavonoïdes planaires (quercétine, kaempférol) ; la modification de l'épaisseur et du degré de pontage du peptidoglycane en réponse aux stress antibactériens (mécanisme d'adaptation général au vancomycine-VISA) ; et la formation de microcolonies en biofilm qui réduisent l'accès des composés phénoliques aux cellules bactériennes à l'intérieur du biofilm (Coppo & Marchese, 2014). Des études récentes suggèrent que des combinaisons synergiques de quercétine ou d'épigallocatechine gallate (EGCG) avec la gentamicine ou l'oxacilline peuvent restaurer la sensibilité des SARM à des antibiotiques bêta-lactamines, en inhibant la NorA et en potentialisant l'accumulation intracellulaire des agents antimicrobiens (Górniak *et al.*, 2019).

### ***Escherichia coli* CMI = 10 mg/mL (10 000 µg/mL):**

La CMI la plus élevée enregistrée pour *E. coli* ATCC 25923 confirme la résistance intrinsèque de cette espèce aux polyphénols hydrophiles. En plus des mécanismes discutés en §3.3.2 (membrane LPS, pompe AcrAB-TolC), la compartimentation cellulaire d'*E. coli* grâce au périplasma situé entre les deux membranes constitue une zone tampon supplémentaire contenant des estérases, lactonases et oxydoréductases capables de métaboliser et d'inactiver certains composés phénoliques avant qu'ils n'atteignent la membrane cytoplasmique ou les cibles intracellulaires (Laxminarayan et al., 2013). La valeur de CMI de 10 mg/mL (10 000 µg/mL) classe donc l'extrait aqueux comme faiblement actif vis-à-vis d'*E. coli* selon Aligiannis et al. (2001), ce qui est cohérent avec la littérature sur les extraits aqueux de Lamiaceae vis-à-vis des entérobactéries.

### **Comparaison avec les huiles essentielles et les extraits organiques de *T. vulgaris* :**

Les CMI des huiles essentielles de *T. vulgaris* riches en thymol et carvacrol deux phénols volatils lipophiles rapportées dans la littérature s'échelonnent de 0,125 à 2 mg/mL (125 à 2 000 µg/mL) vis-à-vis des mêmes espèces bactériennes (Cosentino et al., 1999 ; Dorman & Deans, 2000 ; Al-Bayati, 2006). La différence d'un facteur 5 à 80 entre ces valeurs et celles de l'extrait aqueux de la présente étude illustre de manière quantitative le rôle déterminant du mode d'extraction dans la capture des composés les plus actifs de *T. vulgaris*. Cependant, l'extrait aqueux présente des avantages cliniques et réglementaires considérables : absence de phytotoxicité et de cytotoxicité aux concentrations thérapeutiques, parfaite compatibilité avec la voie orale et la voie topique, absence de solvant résiduel toxique, et concordance avec les pratiques traditionnelles d'infusion et de décoction validées par des siècles d'usage ethnométrical (WHO, 2013). Ces caractéristiques font de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* un candidat pertinent pour des applications de phytothérapie de première ligne, notamment dans le traitement d'infections bactériennes superficielles ou la prophylaxie d'infections alimentaires à *B. cereus*.

### 3.5. Corrélacion entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antibactérienne

L'ensemble des résultats obtenus permet de dégager une corrélation qualitative entre la richesse phénolique de l'extrait aqueux (110 mg EAG/g ES) et son activité antibactérienne modérée. Cette corrélation, largement documentée dans la littérature phytopharmacologique (Huang et al., 2010 ; Li et al., 2020), repose sur le fait que les composés phénoliques constituent les principaux agents bioactifs de *T. vulgaris* dans les préparations aqueuses, en l'absence des monoterpènes phénoliques volatils non extractibles par ce solvant.

Néanmoins, il est important de souligner que la teneur en polyphénols totaux mesurée par la méthode de Folin-Ciocalteu constitue un indicateur global et non spécifique, qui ne permet pas de distinguer les contributions relatives des différentes classes de composés phénoliques à l'activité antibactérienne observée.

**Conclusion**

## Conclusion

La présente étude avait pour objectif d'évaluer le potentiel phytochimique et l'activité antibactérienne *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* L. (Lamiacée) récoltées dans la région de Tizi Ouzou (Algérie), dans le contexte de la valorisation des ressources phytothérapeutiques locales face à la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ce travail représente une contribution originale à la phytopharmacologie algérienne, en se distinguant de la majorité des études existantes.

Les principaux résultats obtenus conduisent aux conclusions suivantes :

Rendement d'extraction et caractérisation phytochimique globale : un extrait sec a été obtenu dont la teneur en polyphénols totaux est notable. Cette valeur est cohérente avec les données de la littérature pour des extraits aqueux de *T. vulgaris* et s'explique par la combinaison de facteurs favorables tels que le stade phénologique optimal et les conditions édaphoclimatiques montagneuses stimulant la biosynthèse des polyphénols.

Activité antibactérienne : l'extrait aqueux exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ensemble des souches testées à la concentration étudiée, avec des zones d'inhibition qualifiées de modérées selon la classification de Ponce et *al.* Cette activité témoigne de la capacité des composés phénoliques hydrosolubles tels que les acides phénoliques, flavonoïdes glycosylés et tanins hydrolysables à interférer avec la croissance bactérienne, y compris pour des souches cliniquement importantes telles que SARM et *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentrations Minimales Inhibitrices : les CMI s'échelonnent de faibles à élevées selon les bactéries testées, avec une activité globalement variable. Le profil de sensibilité différentielle observé est cohérent avec les propriétés structurales des parois bactériennes et avec les mécanismes d'action des polyphénols documentés dans la littérature.

Limitations et portée des résultats : l'activité antibactérienne observée reste inférieure à celle des huiles essentielles de *T. vulgaris*, reflétant l'absence de composés monoterpéniques phénoliques volatils tels que le thymol et le carvacrol dans l'extrait aqueux. Par ailleurs, la nature *in vitro* des tests impose une prudence dans l'extrapolation clinique, les conditions physiologiques pouvant modifier la biodisponibilité et l'activité des polyphénols. La mesure globale des polyphénols totaux ne permet pas d'identifier les composés actifs individuels.

Ces résultats, pris dans leur ensemble, confirment le potentiel de *Thymus vulgaris* L. comme source de biomolécules antibactériennes d'intérêt naturel, justifiant la poursuite des investigations selon plusieurs axes complémentaires prioritaires :

- Caractérisation phytochimique individuelle par techniques chromatographiques et spectrométriques afin d'identifier et quantifier les composés phénoliques majeurs et d'établir des corrélations structure-activité.
- Fractionnement biodirigé et isolement des composés actifs par chromatographie, guidé par les résultats biologiques, afin d'identifier les fractions les plus actives et les synergies potentielles.
- Étude des mécanismes d'action au niveau moléculaire par des approches microscopiques et biochimiques visant à comprendre les effets sur l'intégrité cellulaire bactérienne, la membrane et les systèmes d'efflux.
- Évaluation de la cytotoxicité et de la sélectivité sur des lignées cellulaires eucaryotes afin de déterminer l'innocuité relative et les indices de sélectivité.
- Études *in vivo* dans des modèles d'infection expérimentale afin de confirmer l'efficacité, la tolérance et le comportement pharmacologique dans des conditions physiologiques réelles.
- Développement de formulations phytopharmaceutiques adaptées (topiques, orales ou contrôlées) associées à une standardisation en composés actifs.

En définitive, ce travail s'inscrit dans une dynamique scientifique internationale de valorisation des ressources naturelles médicinales contre l'antibiorésistance, et contribue à l'enrichissement de la base de données phytopharmacologique algérienne. Il souligne la nécessité d'une approche intégrée (ethnobotanique, phytochimique, microbiologique et pharmacologique) pour transformer le potentiel thérapeutique des plantes médicinales locales en applications cliniques validées, sûres et efficaces .

## **Références Bibliographique**

## Références Bibliographique

- Abass, K., Parveen, R., Irfan, M., Malik, Z., Husain, S. A., & Ahmad, S. (2024). Mechanism of antibacterial phytoconstituents: An updated review. *Archives of Microbiology*, 206, 325.
- Ahanger, M. A., et al. (2023). Condensed tannins (proanthocyanidins) in plants: Distribution, biosynthesis and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 22(3), 645–678.
- Al-Bayati, F. A. (2006). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 403–406.
- Al-Bayati, F. A. (2008). Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7, 5.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170.
- Aljabeili, H. S., Barakat, H., & Abdel-Rahman, H. A. (2018). Chemical composition of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil and its effect on multidrug-resistant bacteria. *Food and Nutrition Sciences*, 9(5), 433–447.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG IV). (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., et al. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.

- Baba Aïssa, F. (1991). *Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb*. Alger : Éditions EDAS.
- Bagniewska-Zadworna, A., Arasimowicz-Jelonek, M., & Smoliński, D. J. (2014). Lignification as a defence reaction of plants against biotic and abiotic stresses. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 56(1), 7–19.
- Benarfa, A. (2005). *Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou*. Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174–189. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.6050>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Phytochemical screening and evaluation of antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Origanum compactum*. *Journal of Natural Products and Resources*, 3(1), 1–5.
- Cicco, N., & Lattanzio, V. (2011). The influence of initial carbonate concentration on the Folin–Ciocalteu micro-method for the determination of phenolics with low concentration in the presence of methanol: A comparative study of real-time monitored reactions. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(7), 840–848. <https://doi.org/10.4236/ajac.2011.27100>
- CLSI. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (32nd ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

- Compaoré, M., Ouédraogo, N., Kiendrebeogo, M., & Nacoulma, O. G. (2025). Antibacterial activity evaluation of medicinal plant extracts by disk diffusion method. *African Journal of Microbiology Research*, 19(2), 45–53.
- Compean, K. L., & Ynalvez, R. A. (2014). Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. *Research Journal of Medicinal Plants*, 8(5), 204–213. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 380–390. <https://doi.org/10.2174/138920101504140825121142>
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00581.x>
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1250–1318). American Society of Plant Physiologists.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linssen, J. P. H. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 140–146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199709\)77:1<140::AID-JSFA18>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199709)77:1<140::AID-JSFA18>3.0.CO;2-K)
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., Akhter, N., et al. (2023). Phytochemical composition and biological activities of *Thymus vulgaris*: A comprehensive review. *Journal of Herbal Medicine*, 39, 100650.

- De Rossi, S., Rocchetti, G., Lucini, L., & Rebecchi, A. (2025). Antimicrobial potential of polyphenols: A focus on mechanism of action. *Antioxidants*, 14(2), 200.
- De Rossi, S., Rocchetti, G., Lucini, L., & Rebecchi, A. (2025). Antimicrobial potential of polyphenols: A focus on mechanism of action. *Antioxidants*, 14(2), 200.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- El Ouali Lalami, A., El-Akhal, F., & Ouedrhiri, W. (2013). Ethnobotanical study and antibacterial activity of medicinal plants used in traditional medicine in Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(28), 2085–2093.
- EMA. (2013). Community herbal monograph on *Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). London, United Kingdom.
- EUCAST. (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (Version 12.0). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Górnjak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., Heredia, J. B., & Salazar-López, N. J. (2016). Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archives of Latinoamerican Nutrition*, 66(2), 87–100.

- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale* (2e éd.). Bruxelles : De Boeck Université.
- Hrytsyna, M., Yarema, O., Kichura, H., & Yaremchuk, O. (2019). Morphological characterisation of *Thymus vulgaris* L. *Scientific Horizons*, 22(10), 23–30.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Wilkinson, M. (2013). Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan Journal of Chemistry*, 6(4), 751–756.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(4), 691–700. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00119-X)
- Jain, P., & Choudhary, S. (2022). Phytochemistry and pharmacological activities of *Thymus vulgaris*: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(5), 1805–1815.
- Jeandet, P., Douillt, D., Bessis, R., Debord, S., & Sbaghi, M. (2010). Phytoalexines de la famille des stilbènes : biosynthèse et activité biologique. *Phytothérapie*, 8(6), 355–364.
- Kong, J. M., Goh, N. K., Chia, L. S., & Chia, T. F. (2020). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1), 7–21.
- Kowalska, I., Cieśla, Ł., Sowa, I., & Wójciak-Kosior, M. (2025). Polyphenolic composition and bioactivity of *Thymus vulgaris*. *Molecules*, 30(1), 115.

- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In F. Imperato (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research* (pp. 23–67). Research Signpost.
- Laurichesse, S., & Avérous, L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*, 39(7), 1266–1290. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., & Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—The need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2020). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 12(4), 1180. <https://doi.org/10.3390/nu12041180>
- Lucchini, J. J., Corre, J., & Crémieux, A. (1990). Antibacterial phenolic compounds. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(3), 201–208.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H. S., De Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., De Feo, V. (2015). Chemical composition and biological activity of *Origanum vulgare* L. *Chemistry & Biodiversity*, 12(5), 812–823. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400289>

- Mehmood, A., Khanum, H., Saeed, M., & Ishtiaq, M. (2015). Phenolic content, antioxidant activity and phytochemical screening of medicinal plants. *Pakistan Journal of Botany*, 47(3), 967–972.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15(12), 9252–9287. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Miara, M. D., Teixidor-Toneu, I., Batties, A., & Sahnoun, T. (2017). Traditional knowledge of medicinal plants in the Algerian Sahara: An ethnobotanical study. *Journal of Arid Environments*, 145, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.05.001>
- Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids in therapeutics: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00187-7>
- Nateqi, M., Sadeghpour, H., & Sharifi-Rad, J. (2018). Chemical composition of *Thymus vulgaris* and biological activities. *Journal of Herbal Medicine*, 14, 45–50.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4(3), 63. <https://doi.org/10.3390/medicines4030063>
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2020). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 7(7), 37. <https://doi.org/10.3390/medicines7070037>
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382–388. <https://doi.org/10.1126/science.8153625>

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Philava, M., Selvakumar, S., Ramkumar, S., et al. (2018). Lignans: A class of plant secondary metabolites with diverse bioactivities. *Natural Product Research*, 32(8), 896–910.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317–1333. <https://doi.org/10.1039/C2NP20049J>
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme, sage and marjoram extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., et al. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1688–1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl.), 215S–217S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>
- Sérémé, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2008). Tanins des plantes tannifères : propriétés et utilisations. *Journal de la SOACHIM*, 25(1), 55–61.

- Shahnawaz, M., Dar, R. A., Bhat, S. A., & Mir, R. A. (2023). Natural compounds as anti-inflammatory agents. *Natural Product Research*, 37(10), 1678–1692. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2015804>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (2002). *Thyme: The Genus Thymus*. London: Taylor & Francis.
- Sussman, A., Tükösd, M., & Kálmán, M. (2020). Plant stress metabolites. *Current Biology*, 30(8), R345–R350. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.009>
- Taher, M. A., Bamosa, A., & Al-Mukahal, M. (2021). A comprehensive review on *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 171, 113886. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113886>
- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., & Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3133–3141. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vernet, P., Gouyon, P. H., & Valdeyron, G. (1977). Genetic control of the oil content in thyme. *Genetica*, 47(1), 97–106. <https://doi.org/10.1007/BF00123689>
- Vouillamoz, J., Carlen, C., & Slacanin, I. (2011). Characterization of thyme using morphological traits. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(2), 187–202. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01118.x>

- WHO. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2022). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2020). What is new in lysozyme research and its application in food industry? *Food Chemistry*, 274, 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>
- Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., & Aberkane, M. C. (2011). Activité antimicrobienne des extraits de *Thymus vulgaris*. *Phytothérapie*, 9(6), 361–366.

## **Annexes**

## Annexes

### Annexe 01 : Inventaire du matériel utilisé

#### 1. Réactifs et solutions

Réactif / Solution	Rôle dans l'expérience	Fournisseur / Remarque
Acide gallique ( $\geq 99\%$ de pureté)	Étalon externe pour la courbe de calibration du dosage des PPT	Sigma-Aldrich ou équivalent
Réactif de Folin-Ciocalteu	Agent chromogène pour le dosage spectrophotométrique des PPT	Commercial, dilué au 1/10 avant usage
Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 7,5 %)	Alcalinisation du milieu, stabilisation du complexe coloré	Préparé extemporanément
Eau distillée stérile	Solvant d'extraction, préparation des solutions, blanc réactif	
Eau physiologique stérile ( $\text{NaCl}$ 0,9 %)	Suspension et standardisation des inoculums bactériens	Préparée et autoclavée
Extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris</i>	Substance d'intérêt testée	Préparé selon le protocole §2.4.1
Gentamicine (disques 10 $\mu\text{g}$ )	Témoin positif antibiotique de référence	Disques commerciaux certifiés EUCAST

#### 2. Verrerie et consommables

Article	Utilisation
Béchers en verre borosilicaté (50, 100, 250 mL)	Préparation des solutions et macération
Erlenmeyers (250 mL)	Macération sous agitation magnétique

Article	Utilisation
Pipettes Pasteur stériles	Transferts de petits volumes en conditions aseptiques
Papier filtre Whatman n°1 (Ø 11 µm)	Filtration fine du macérat végétal
Disques Whatman n°1 (Ø 6 mm, stérilisés)	Imprégnation avec l'extrait pour le test de diffusion
Boîtes de Pétri en verre stériles (Ø 90 mm)	Culture bactérienne pour les tests antimicrobiens
Flacons en verre hermétiques	Conservation de l'extrait sec et des solutions
Écouvillons stériles	Ensemencement en stries des boîtes de gélose
Tubes à essais stériles (10 mL)	Préparation des suspensions bactériennes
Entonnoirs en verre	Filtration grossière du macérat
Micropipettes (100, 200, 1000 µL) + cônes stériles	Transferts de volumes précis

### 3. Appareillage

Appareil	Utilisation	Paramètre clé
Balance analytique	Pesée du matériel végétal et des réactifs	Précision ± 0,0001 g
Agitateur magnétique avec chauffage	Macération sous agitation continue	22 ± 2 °C, 24 h
Broyeur électrique à lames	Réduction de la poudre végétale	Tamis 500 µm
Autoclave	Stérilisation des milieux et du matériel	121 °C, 15 min, 1 bar

Appareil	Utilisation	Paramètre clé
Étuve à air chaud	Incubation bactérienne et séchage de l'extrait	37 °C / 40 °C
Spectrophotomètre UV-Visible	Dosage des PPT (760 nm) et lecture des DO (620 nm)	Plage 200–900 nm
Vortex	Homogénéisation des suspensions bactériennes	
Bain-marie	Incubations à température contrôlée	37 °C
Hotte à flux laminaire	Manipulations microbiologiques en conditions aseptiques	Classe I ou II
Pied à coulisse digital	Mesure des zones d'inhibition	Précision $\pm 0,1$ mm

## Annexe 02 : Description des milieux et solutions utilisés

### 1. La macération aqueuse

**Définition et principe :** la macération est une technique d'extraction solide-liquide à froid consistant à mettre un matériel végétal broyé en contact prolongé avec un solvant à température ambiante, dans le but d'extraire par diffusion passive les composés bioactifs solubles contenus dans les cellules végétales. En l'absence de chauffage, cette méthode préserve les composés thermolabiles notamment certains flavonoïdes glycosylés, des enzymes et des vitamines qui seraient dégradés par des méthodes d'extraction à chaud (décoction, infusion à reflux). La cinétique d'extraction est gouvernée par le gradient de concentration entre le solvant et les cellules végétales, selon la loi de Fick. L'agitation mécanique accélère le transfert de masse en renouvelant continuellement le solvant au contact de la poudre végétale (Azmir et *al.*, 2013).

#### Paramètres critiques :

- **Rapport solide/liquide (m/v) :** 1/10 dans la présente étude (20 g / 200 mL). Ce ratio détermine le rendement et la concentration de l'extrait.
- **Durée :** 24 heures, correspondant au temps d'équilibre optimal documenté pour les polyphénols hydrosolubles de *T. vulgaris* (Blainski et *al.*, 2013).
- **Température :**  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (température ambiante du laboratoire), assurant la préservation des composés thermosensibles.
- **Absence de lumière :** protection des composés photosensibles (certains flavonoïdes, anthocyanes) de la dégradation photo-oxydative.
- **Solvant :** eau distillée, extractant préférentiel des composés phénoliques polaires (glycosides, acides phénoliques sous forme de sels).

### 2. L'eau physiologique stérile (sérum physiologique)

**Définition :** solution aqueuse isotonique de chlorure de sodium (NaCl) à 9 g/L (0,9 %, m/v), dont la pression osmotique (environ 308 mOsm/kg) est équivalente à celle des liquides physiologiques bactériens et humains, empêchant ainsi les phénomènes d'hémolyse ou de lyse bactérienne par choc osmotique.

**Composition et préparation :** NaCl (qualité analytique) : 9,0 g ; eau distillée q.s.p. : 1 000 mL. La solution est ajustée à  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ , répartie en aliquotes de 9 mL dans des tubes à essais

bouchés et stérilisée à l'autoclave (121°C, 15 min). Conservation à température ambiante, à l'abri de la lumière, au maximum 1 mois après préparation.

**Utilisation dans cette étude :** suspension des colonies bactériennes pour préparation de l'inoculum, standardisation de la turbidité à l'étalon 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), et dilutions en série pour la détermination des CMI.

### 3. Le milieu Mueller-Hinton (gélose MH)

**Définition et justification :** le milieu Mueller-Hinton (MH) est un milieu de culture non sélectif, standardisé et recommandé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) pour la réalisation des tests de sensibilité aux antimicrobiens par la méthode de diffusion en disques (Kirby-Bauer). Ce choix est motivé par plusieurs propriétés : (1) faible teneur en inhibiteurs de sulfonamides et triméthopime (thymidine, thymine) ; (2) teneur en calcium et magnésium calibrée pour les tests aux aminoglycosides et tétracyclines ; (3) diffusion homogène et reproductible des agents antimicrobiens ; et (4) croissance satisfaisante de la majorité des bactéries non exigeantes (Wiegand et *al.*, 2008).

#### Composition (pour 1 litre) :

Composant	Quantité
Hydrolysate de caséine (source d'acides aminés)	17,5 g
Extrait de viande bœuf (source de facteurs de croissance)	2,0 g
Amidon de maïs (neutralisant les inhibiteurs)	1,5 g
Agar bactériologique (gélifiant)	17,0 g
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0,015 g
Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> )	0,015 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 mL
pH final après autoclavage	7,3 ± 0,1

**Préparation :** 38 g de poudre commerciale déshydratée sont mis en suspension dans 1 L d'eau distillée, portés à légère ébullition sous agitation pour dissolution complète, puis stérilisés à 121°C pendant 15 minutes (autoclave). Le milieu est ensuite coulé en boîtes de Pétri ( $20 \pm 1$  mL/boîte) dans une hotte à flux laminaire. L'épaisseur finale de la gélose doit être de  $4 \pm 0,5$  mm, paramètre critique pour la reproductibilité des zones d'inhibition (EUCAST, 2022). Les boîtes sont conservées à 4°C, à l'abri de la lumière, au maximum 2 semaines.

## Annexe 03 : Caractérisation des souches bactériennes de référence

Les quatre souches bactériennes de référence utilisées dans cette étude sont des souches certifiées ATCC (American Type Culture Collection), garantissant leur authenticité, leur pureté génomique et leur stabilité phénotypique. Leur description taxonomique, microbiologique et clinique est présentée ci-dessous.

### 1. *Escherichia coli* ATCC 25923

*Escherichia coli* est une entérobactérie Gram-négative appartenant à la famille des Enterobacteriaceae (ordre Enterobacterales). C'est un bacille droit ( $0,5 \times 1-3 \mu\text{m}$ ), mobile par flagelles péritriches, non sporulant, anaérobie facultatif, fermentant le glucose avec production d'acide et de gaz, et produisant de l'indole à partir du tryptophane (test positif). En tant que membre du microbiote intestinal commensale de l'homme et des mammifères, *E. coli* joue un rôle bénéfique dans la colonisation de résistance et la synthèse de vitamine K<sub>2</sub>. Cependant, des souches pathogènes (pathotypes EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, ExPEC) sont responsables d'un large spectre de maladies : diarrhées simples à hémorragiques (syndrome hémolytique et urémique dû à l'EHEC O157:H7), infections urinaires (cystites, pyélonéphrites), méningites néonatales et septicémies. *E. coli* est également le principal indicateur microbiologique de contamination fécale des eaux et aliments (Wiegand et al., 2008). La souche ATCC 25923 est la souche de référence internationale utilisée pour le contrôle qualité des antibiogrammes.

### 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille Gram-négatif, strictement aérobie, de la famille des Pseudomonadaceae. C'est l'un des pathogènes opportunistes les plus redoutables en milieu hospitalier, classé en priorité critique par l'OMS dans sa liste des agents pathogènes nécessitant le développement urgent de nouveaux antibiotiques (WHO, 2022). Ses caractéristiques bactériologiques distinctives incluent : (1) une pigmentation naturelle bleu-verdâtre liée à la production de pyocyanine (phénazine) et de pyoverdine (sidérophore fluorescent jaune-vert) ; (2) une odeur caractéristique de raisin (liée à la production de 2-aminoacétophénone) ; (3) une très grande versatilité métabolique permettant la colonisation de nombreuses niches écologiques (sol, eau, milieux humides hospitaliers, dispositifs médicaux) ; et (4) une résistance intrinsèque exceptionnelle aux antibiotiques, attribuée à la faible perméabilité de la membrane externe (teneur élevée en LPS et porines à faible conductance), à la surexpression de pompes

d'efflux multidrogues (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY) et à la production d'enzymes inactivatrices (BLSE, carbapénémases). La souche ATCC 27853 est la souche de référence pour les tests d'antibiogramme aux céphalosporines et aux carbapénèmes (Nikaido, 1994).

### 3. *Bacillus cereus* ATCC 10876

*Bacillus cereus* est un bacille Gram-positif, aérobie-anaérobie facultatif, de la famille des Bacillaceae, caractérisé par la formation de spores ovales centrales à sub-terminales. Ces endospores sont hautement résistantes à la chaleur (survie à 100°C), à la dessiccation, aux UV et à de nombreux désinfectants, ce qui confère à *B. cereus* une persistance remarquable dans les environnements alimentaires et les surfaces. C'est un pathogène alimentaire majeur, responsable de deux syndromes de toxi-infection distincts : (1) le syndrome émétique (vomissements 1–5 h après ingestion), médié par la céréulide peptide cyclique thermostable produite dans l'aliment ; et (2) le syndrome diarrhéique (8–16 h), médié par des entérotoxines protéiques (hémolysine BL, entérotoxine non hémolytique) sécrétées in vivo dans l'intestin. Des infections opportunistes graves (endophtalmies, fasciites nécrosantes, bactériémies) sont rapportées chez les immunodéprimés. La paroi cellulaire épaisse en peptidoglycane (15–80 nm), dépourvue de membrane externe lipopolysaccharidique, explique la plus grande perméabilité de cette bactérie aux composés phénoliques (Coppo & Marchese, 2014).

### 4. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

*Staphylococcus aureus* est un cocci Gram-positif, catalase-positif, coagulase-positif, de la famille des Staphylococcaceae. Sa morphologie caractéristique en amas irréguliers (grappes de raisin) résulte de divisions cellulaires dans plusieurs plans de l'espace. C'est un pathogène majeur de l'homme, responsable d'un très large spectre d'infections : cutanées (impétigo, furoncles, fasciites nécrosantes), des voies respiratoires (pneumonies), ostéoarticulaires (ostéomyélites), cardiovasculaires (endocardites), systémiques (septicémies, syndrome du choc toxique staphylococcique). Ses nombreux facteurs de virulence incluent des toxines (leucocidine de Panton-Valentine/PVL, toxines exfoliatives, TSST-1) et des mécanismes d'évasion immunitaire (protéine A, capsule polysaccharidique). La souche ATCC 43300 est une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) de référence internationale, possédant le gène *mecA* codant pour la PBP2a (protéine liant la pénicilline de faible affinité), conférant une

résistance à toutes les bêta-lactamines. Cette caractéristique en fait un modèle de référence pour l'évaluation d'agents antibactériens potentiellement actifs sur les SARM (Coppo & Marchese, 2014 ; WHO, 2022).