



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

THEME

Effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur la
croissance et la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus*

Réalisé par :

TAOUACHI Chahira

ABDESSLAM Malika

Soutenu le 30/06/2025 devant le jury composé de :

Présidente	Mme HANSAL N.	MAA	U. Khemis Miliana
Promotrice	Mme LATTAB A.	MCA	U. Khemis Miliana
Examinatrice	Mme BENZAOUK S.	MCA	U. Khemis Miliana

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le Tout-Puissant qui nous a donné la force et la volonté nécessaires pour mener à bien cette étude.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à **MmeLATTAB A**, qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et ses orientations éclairées tout au long de cette recherche.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements aux deux membres du jury, **MmeHANSAL N** et **MmeBENAZZOUK S**, pour avoir accepté de présider, d'examiner et d'évaluer notre mémoire avec attention et bienveillance.*

*Nos remerciements vont aussi au laboratoire **Zebouche Abdellah**, pour son accueil chaleureux, les moyens mis à notre disposition et son appui durant la phase expérimentale de notre travail.*

Dédicace

Avant tout, et du fond du cœur...

À mes deux plus grandes richesses,

à ma mère bien-aimée, qui m'a soutenue à chaque étape, par sa patience, ses prières et son amour inconditionnel,

et à mon père chéri, toujours présent, toujours fier, toujours là pour moi.

Ce travail est le fruit de votre foi en moi. Merci du fond du cœur.

À celui qui a toujours été mon soutien et ma force,

à mon cher frère Fatih, merci pour ton appui constant et ton encouragement sans faille.

À mes chères sœurs, compagnes de vie et de cœur,

Malak, Hanan, Djahida et Zahra,

je vous remercie pour votre amour, votre présence et vos mots qui m'ont portée dans les moments difficiles.

À toutes mes amies fidèles qui m'ont accompagnée sur ce chemin,

et tout particulièrement à mon amie Saadia, merci pour ta sincérité et ton soutien indéfectible.

À ma grand-mère, que Dieu ait son âme,

ta tendresse et tes prières continuent de m'accompagner. Ce travail est aussi pour toi.

À ma cousine Khawla, merci du fond du cœur pour ta présence et ton affection.

Et à toutes celles et ceux qui m'aiment, merci d'être là, simplement.

.Malika

Dédicace

Avant tout, je rends grâce à Allah Tout-Puissant, qui m'a accordé la force, la santé et les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail.

Je tiens à dédier humblement ce modeste travail :

À mon cher père,

mon pilier et source de ma joie et de mon bonheur. Merci pour l'éducation que tu nous as offerte et pour tous les efforts que tu as toujours fournis pour notre réussite.

À ma chère mère,

la plus belle chose de ma vie.

Aucune parole ne saurait exprimer mon amour éternel, mon respect et ma reconnaissance envers toi. Merci pour tout le soutien et l'amour que tu m'as donnés. Que tes bénédictions m'accompagnent toujours.

À mes frères bien-aimés :

Nasser et Mohamed Hicham.

À ma chère sœur :

Bayan.

À mes grands-parents :

Papa Ahmed et Mani.

À ma famille :

la famille Taouachi et la famille Mechidi.

À ma camarade qui m'a accompagnée dans ce travail.

À toutes mes amies chères.

Et à tous ceux que j'aime.

.Chahira

الملخص

في مواجهة الانتشار المتزايد للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية وأجهزة المناعة بفضل ظهور آليات المقاومة والقدرة على تكوين الأغشية الحيوية مما يجعل علاج هذه الالتهابات أكثر تعقيداً، أصبح من الضروري البحث عن بدائل طبيعية. في هذا السياق، تبحث هذه الدراسة في تقييم التأثيرات المضادة للبكتيريا والأغشية الحيوية للزيوت الأساسية من زيوت *Menthapulegium* التي تم حصادها في فترتين مختلفتين ضد المكورات العنقودية الذهبية **ATCC 25923**.

يُظهر استخلاص الزيوت العطرية من النبات المجفف باستخدام تقنية التجريد بالبخار أن محصول الاستخلاص يبلغ 0.63% للعينة التي تم حصادها في يوليو 2024، بينما يبلغ 0.24% فقط للعينة التي تم حصادها في أبريل 2025.

كشفت تقييم النشاط المضاد للجراثيم عن طريق الأروماتوغرام عن مناطق تثبيط قدرها 23 ملم للزيت العطري للنبات المحصود في يوليو 2024 و 24 ملم للعينة المحصودة في أبريل 2025. وأظهر تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) والحد الأدنى للتركيز القاتل للجراثيم (MBC) أن التركيز المثبط للجراثيم في العينة التي تم حصادها في يوليو 2024 كان قدره 0.31 ملغ/مل، وتركيز قاتل للجراثيم قدره 1.25 ملغ/مل، بينما العينة التي تم حصادها في أبريل 2025 كان التركيز المثبط للجراثيم يساوي التركيز القاتل للجراثيم (0.31 ملغ/مل)، مما يدل على أن هذا الزيت له تأثير مبيد ضد البكتيريا التي تم اختبارها.

بالإضافة إلى ذلك، تشير دراسة تأثير التركيزات دون المثبطة لهذه الزيوت على تكون الأغشية الحيوية عند بكتيريا *S. aureus* عن طريق التحليل البنفسجي البلوري إلى انخفاض كمية الأغشية الحيوية المكونة بزيادة تركيز الزيوت العطرية المختبرة.

تشير هذه النتائج إلى أن زيت *Menthapulegium* يمكن أن يشكل بديلاً واعدًا في مكافحة عدوى المكورات العنقودية الذهبية، وخاصة تلك المرتبطة بتكوين الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية :

المكورات العنقودية الذهبية، الأغشية *Menthapulegium*، الزيت العطري، النشاط المضاد للبكتيريا، الأغشية الحيوية

Résumé

Face à la diffusion croissante des bactéries résistantes aux antibiotiques et aux systèmes immunitaires grâce à l'émergence des mécanismes de résistances et à la capacité à former des biofilms, ce qui rend le traitement de ses infections plus compliqué, il devient nécessaire de rechercher des alternatives naturelles. Dans ce cadre, cette étude s'intéresse à l'évaluation de l'effet antibactérien et l'effet anti-biofilm des huiles essentielles de *Menthapulegium* récoltés dans deux périodes différents contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

L'extraction des huiles essentielles à partir de la plante séchée par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau montre que le rendement d'extraction est de 0,63 % pour l'échantillon récolté en Juillet 2024, tandis qu'il est seulement de 0,24 % pour celui récolté en Avril 2025.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par l'aromatogramme a révélé des zones d'inhibition de 23 mm pour l'huile essentielle de *Menthapulegium* récoltée en Juillet 2024 et de 24 mm pour l'échantillon récolté en Avril 2025. Puis, la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a montré que l'huile essentielle de l'échantillon récolté en juillet 2024 avait une CMI de 0,31 mg/mL et une CMB de 1,25 mg/mL, tandis que celui de l'échantillon récolté en Avril 2025 présentait une CMI égale à la CMB (0,31 mg/mL) et qui montre que cette l'huile exerce un effet bactéricide contre la bactérie testée.

En outre, l'étude de l'effet des concentrations subinhibitrice de ces huiles sur la formation de biofilm chez *S. aureus* par l'analyse cristal violet indique une diminution dans la quantité de biofilm formé par l'augmentation de la concentration des huiles essentielles testés.

Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de *Menthapulegium* pourrait constituer une alternative prometteuse dans la lutte contre les infections à *S. aureus*, notamment celles associées à la formation de biofilms.

Mots clés: *Staphylococcus aureus*, *Menthapulegium*, l'huile essentielle, activité antibactérienne, biofilm.

Abstract

Faced with the increasing spread of bacteria resistant to antibiotics and immune systems thanks to the emergence of resistance mechanisms and the ability to form biofilms, making the treatment of these infections more complicated, it is becoming necessary to look for natural alternatives. In this context, this study evaluates the antibacterial and anti-biofilm effects of *Mentha pulegium* essential oils harvested in two different periods against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Extraction of the essential oils from the dried plant using the steam stripping technique shows that the extraction yield is 0.63% for the sample harvested in July 2024, while it is only 0.24% for the sample harvested in April 2025.

Evaluation of antibacterial activity by aromatogram revealed zones of inhibition of 23 mm for *Mentha pulegium* essential oil harvested in July 2024 and 24 mm for the sample harvested in April 2025. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) showed that the essential oil in the sample harvested in July 2024 had an MIC of 0.31 mg/mL and an MBC of 1.25 mg/mL, while that in the sample harvested in April 2025 had an MIC equal to the MBC (0.31 mg/mL), showing that this oil exerts a bactericidal effect against the bacteria tested.

Furthermore, the study of the effect of sub-inhibitory concentrations of these oils on biofilm formation in *S. aureus* by crystal violet analysis indicates a decrease in the amount of biofilm formed by increasing the concentration of the EOs tested.

These results suggest that *Mentha pulegium* essential oil could be a promising alternative in the fight against *S. aureus* infections, particularly those associated with biofilm formation.

Key word: *Staphylococcus aureus*, *Mentha pulegium*, essential oil, antibacterial activity, biofilm.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre 1 :

Staphylococcus aureus

1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.1. Historique.....	4
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.1. Classification phylogénique.....	5
1.2.2. Habitat	5
1.2.3. Description et Critères d'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.2.3.1. Caractères morphologiques.....	5
1.2.3.2. Caractères cultureux.....	6
1.2.3.3. Caractères biochimiques.....	7
1.3. Facteurs de virulence	7
1.3.1. Les protéines de surface.....	8
1.3.1.1. Les facteurs d'adhésion	8
1.3.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose	9
1.3.3. Les exoenzymes.....	9
1.3.4. Toxines	10
1.4. Pouvoir pathogène	11
1.5. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	12
1.5.1. Résistance à la pénicilline.....	12
1.5.2. Résistance à la méticilline	13
1.5.3. Résistance à la vancomycine.....	13
1.5.4. Autres mécanismes de résistance.....	13

Chapitre 2:

Biofilms chez *Staphylococcus aureus*

2. Biofilms chez <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1. Présentation de biofilm	15
2.2. La composition de matrice du biofilm.....	15
2.3. Les étapes de formation de biofilm.....	16

2.3.1. Adhérence réversible.....	16
2.3.2. Adhérence irréversible.....	16
2.3.3. Croissance et maturation du biofilm	17
2.3.4. Le détachement.....	17
2.4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm.....	18
2.4.1. Caractéristiques de la surface.....	18
2.4.2. Caractéristiques du milieu.....	18
2.4.3. Propriétés cellulaires.....	18
2.5. Les infections associées aux biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6. Résistance du biofilm.....	19
2.6.1. Résistance du biofilm aux antibiotiques.....	19
2.6.2. Résistance de biofilm aux systèmes immunitaires	20
2.7. Système de régulations impliquées dans la formation de biofilm	20
2.7.1. Quorum Sensing.....	21
2.7.2. Système Régulateur à Deux Composants	22
2.7.2.1. Le deuxième messenger	22
2.7.2.2. SARNs	23

Chapitre 3:

Les huiles essentielles de *Mentha pulegium*

3. Les huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i>	25
3.1 Les plantes aromatiques	25
3.2. Les huiles essentielles.....	25
3.2.1. Historique.....	25
3.2.2. Définition d'huile essentielle.....	26
3.2.3. Localisation des huiles essentielles dans les plantes	26
3.2.4. Le rôle des huiles essentielles dans les plantes.....	26
3.2.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	27
3.2.6. Les principales méthodes d'extraction.....	27
3.2.6.1. Hydrodiffusion.....	27
3.2.6.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	27
3.2.6.3. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	28
3.2.6.4. Extraction par hydrodistillation.....	29
3.3. Le genre <i>Mentha</i>	30

3.3.1. <i>Mentha pulegium</i>	30
3.3.1.1. Définition	30
3.3.1.2. Description botanique	30
3.3.1.3. Position systématique:	31
3.3.1.4. Usages traditionnels	31
3.4. Composition phytochimique de <i>Mentha pulegium L.</i>	32
3.4.1. Les composés phénoliques	32
3.4.1.1. Les flavonoïdes.....	32
3.4.1.2. La lutéoline.....	32
3.4.1.3. L'apigénine	32
3.4.1.4. Les acides phénoliques.....	32
3.4.2. Les tanins	33
3.4.3. Les terpènes	33
3.4.4. les huiles essentielles de <i>Mentha pulegium L.</i>	33
3.5. Activités biologique des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium L.</i>	34
3.5.1. Activité antibactérienne.....	34
3.5.2. Activité antifongique.....	34
3.5.3. Activité antioxydante.....	35
3.6. Toxicité.....	35

Chapitre 4:

Matériel et méthodes

4. Matériel et méthodes.....	37
4.1. Objectif de l'étude.....	37
4.2. La bactérie testée	37
4.2.1. Purification.....	37
4.2.2. Identification	37
4.2.2.1. Examen microscopique	37
4.2.2.2. Recherche de la catalase	38
4.2.2.3. Recherche de la coagulase	38
4.2.2.4. Système d'identification biochimique API Staph	39
4.3. Antibiogramme	39
4.4. Matériel végétal.....	41
4.4.1. Détermination de taux de l'humidité.....	41
4.4.2. Extraction de l'huile essentielle	42

4.4.3. Calcul du rendement d'extraction	43
4.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des HES d' <i>Mentha pulegium</i> L.....	44
4.5.1. Méthode de diffusion en disque (aromatogrammes)	44
4.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	44
4.5.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	45
4.6. Effet des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> L sur la formation de biofilm.....	45

Chapitre 5:

Résultats et discussion

5. Résultats et Discussion.....	47
5.1 Le taux d'humidité	47
5.2 Rendement d'extraction des huiles essentielles chez <i>Mentha pulegium</i>	48
5.3. Revivification et purification de la bactérie testée	49
5.3.1. Sur le bouillon nutritif.....	49
5.3.2. Sur la gélose nutritive (GN)	50
5.3.3. Sur le milieu Chapman.....	50
5.3.4. Sur milieu Baird-Parker	51
5.4 Observation microscopique (Coloration de Gram).	51
5.5. Test de la catalase	52
5.6. Test de coagulase	52
5.7. Résultat d'identification par galerie Api Staph	53
5.8. Etude de la sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques (Antibiogramme)	53
5.9. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> ..	55
5.9.1. Résultats d'aromatogramme.....	55
5.10. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	57
5.11. L'effet des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> sur la formation de biofilm par <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Conclusion	64
Les références	67
Annexes	72

Liste des tableaux

Tableau N° 1: Toxines impliquées dans la virulence de <i>S. aureus</i> (Vincenot et al., 2008). ...	11
Tableau N° 2: Rendement d'extraction en huiles essentielles de <i>Mentha pulegium L.</i>	48
Tableau N° 3: Résultats de l'antibiogramme de la souche testé de <i>Staphylococcus aureus</i> suivant les valeurs de référence fournies par CA-SFM 2024.	55

Liste des figures

Figure N° 1: Aspect morphologique de <i>S. aureus</i> en microscope optique (A) (X1000) et en microscope électronique (B) (X15000) (El-Anzi, 2014).....	6
Figure N° 2: Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par <i>S.aureus</i> (Bronner et al., 2003).....	7
Figure N° 3: Les étapes de formation de biofilm (Teodósio et al., 2013).....	17
Figure N° 4: Le rôle du système de quorum sensing Agr dans la formation du biofilm chez <i>S. aureus</i> (Boles et Horswill, 2008).	22
Figure N° 5: Représentation schématique de l'hydrodistillation (Hashemi et al., 2018).....	27
Figure N° 6: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Hubert, 1992).	28
Figure N° 7: L'appareillage du système de l'hydrodistillation sous micro-ondes (Chemat et al., 2012).....	28
Figure N° 8: Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia, 2011).....	29
Figure N° 9: Morphologie générale de la menthe pouliot (Bencheikh, 2012 ; Gerenutti, 2014).	31
Figure N° 10 : <i>Mentha pulegium</i> 2024 (Juillet).	41
Figure N° 11 : <i>Mentha pulegium</i> 2025 (Avril).....	41
Figure N° 12: Feuille de <i>Mentha pulegium</i> (Fliou) avant et après séchage (photo originale).	42
Figure N° 13: L'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau utilisé pour l'extraction des HEs de <i>Mentha pulegium</i>	43
Figure N° 14: Le taux d'humidité de la plante <i>Mentha pulegium L.</i> récoltée en 2025.	47
Figure N° 15: Aspect de la souche testée dans un Bouillon Nutritif (photo personnelle).....	49
Figure N° 16: Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur la gélose nutritive (photo personnelle) .	50
Figure N° 17: Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman (photo personnelle). ..	50
Figure N° 18: Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu Baird-Parker (photo personnelle)	51
Figure N° 19: Observation microscopique de la bactérie testée après une coloration de Gram.	51
Figure N° 20: Résultat de test catalase.	52
Figure N° 21: Résultat de test de la coagulase (Photo personnelle).....	52

Figure N° 22: Identification biochimique de la bactérie testée à l'aide d'un API Staph.	53
Figure N° 23: Résultats d'antibiogramme <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques testés (Photo personnelle).....	54
Figure N° 24: Résultat d'aromatogramme des HEs de <i>Mentha pulegium</i> contre <i>S. aureus</i> .(A) l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> récolté en Avril 2025 et (B) pour l'échantillon récolté en Juillet 2024. (Photo personnelle).	56
Figure N° 25: Comparaison des diamètres d'inhibition (en mm) de nos résultats avec d'autres études réalisés sur les huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> contre <i>S. aureus</i>	57
Figure N° 26: CMI de <i>Mentha pulegium</i> a <i>S. aureus</i> (Photo personnelle).....	58
Figure N° 27: CMB de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> récolté en Avril2024 (Photo personnelle).....	58
Figure N° 28: CMB de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> récolté en juillet 2025 (Photo personnelle).	58
Figure N° 29: Effet de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> récolté en juillet 2024 sur laformation de biofilm de <i>staphylococcus aureus</i>	60
Figure N° 30: Effet de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> récolté en avril 2025 sur laformation de biofilm de <i>staphylococcus aureus</i>	61

Liste des abréviations

AFNOR :	Association Française de Normalisation
AI-2 :	Autoinducteur2
AIP :	Auto InducingPeptide
Agr :	Accessorygeneregulator
ARNm :	AcideRibonucléiquemessenger
ATCC :	American Type Culture Collection
Biofilm :	Communauté microbienne adhérente
c-di-GMP/c-di-AMP :	Second messenger cyclique
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNA	Collagen-binding protein A
D-Ala-D-Ala :	D-alanine-D-alanine (résidudepeptidoglycane)
HEs :	Huiles essentielles
MecA :	Gène de résistance à la méthicilline
PGA/ PNAG :	Poly- β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine
PLP2a :	Protéine de Liaison aux Pénicillines 2a
PSMs :	Phénomènes de Surface Modulés
RNAIII :	Petit ARN régulateur issu du système Agr
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SARNs :	petitsARNnon codants
VISA/Hvisa :	<i>Staphylococcus aureus</i> à sensibilité intermédiaire à la vancomycine (hétérogène)

Introduction

Introduction

L'émergence croissante des résistances bactériennes aux antibiotiques constitue un défi majeur en santé publique, notamment face à des pathogènes opportunistes tels que *Staphylococcus aureus*.

Cette bactérie à Gram positif, naturellement présente sur la peau et les muqueuses de l'homme, peut vivre en tant que commensale sans provoquer de symptômes. Toutefois, en cas de rupture de la barrière cutanée ou d'immunodépression, elle devient capable d'envahir les tissus et de provoquer diverses infections.

Staphylococcus aureus est responsable d'un large éventail de pathologies, allant des infections cutanées bénignes aux affections graves telles que les endocardites, les ostéomyélites et les pneumonies. Ce pathogène s'est également distingué par son aptitude à développer une résistance à de nombreux antibiotiques, notamment la méthicilline, donnant naissance à des souches redoutées comme le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline). Cette résistance limite sévèrement les options thérapeutiques et complique la prise en charge des infections (**Rungelrath et DeLeo, 2021**).

Outre sa résistance aux antibiotiques, *S. aureus* possède une autre stratégie d'échappement aux traitements : sa capacité à former des biofilms. Ces structures complexes et protectrices adhérant aux surfaces, notamment les dispositifs médicaux, permettent à la bactérie de survivre dans des conditions hostiles et réduisent considérablement l'efficacité des antimicrobiens conventionnels.

Dans ce contexte, la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques d'origine naturelle est devenue une priorité.

Les huiles essentielles, extraites de plantes médicinales et aromatiques, ont attiré une attention croissante en raison de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-biofilm bien documentées.

Mentha pulegium L., connue sous le nom de menthe pouliot, est une plante traditionnellement utilisée pour ses vertus médicinales et aromatiques, notamment dans les régions méditerranéennes (**Bouyahya et al., 2019**).

Introduction

Ce travail de recherche vise à évaluer l'effet de deux échantillons différents de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ainsi que sur sa capacité à former un biofilm, dans le but d'explorer son potentiel en tant qu'agent naturel antibactérien et inhibiteur de la formation de biofilm.

Cette étude sera subdivisée en deux parties :

- Dans la première partie, nous faisons une étude bibliographique divisée en trois chapitres.
 - Le premier chapitre, il a présente un regard sur la bactérie *Staphylococcus aureus*, les facteurs de virulence et les infections causés par cette bactérie.
 - Le deuxième chapitre, concerne le biofilm chez *Staphylococcus aureus*.
 - Le troisième chapitre sur les huiles essentielles et la plante testée *Mentha pulegium*.
- Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale qui se déroule en deux étapes :
 - La première étape correspond à une étude pratique et qui s'adresse aux parties suivantes
 - Obtention de la bactérie et confirmation par une identification.
 - L'étude de la sensibilité de la bactérie testée aux antibiotiques.
 - Récolte, séchage et préparation des huiles essentielle de la plante *Mentha pulegium*.
 - Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles préparées.
 - Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).
 - L'étude de l'effet des huiles essentielles testées sur la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus*.
 - Dans la deuxième étape nous avons rapporté les résultats obtenus, ainsi que leurs discussions.

A la fin, le manuscrit est achevé par une conclusion qui permettra de résumer les résultats trouvés et tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

Chapitre1

Staphylococcus aureus

1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Historique

Les staphylocoques ont été identifiés pour la première fois en 1878 dans le pus des abcès par Koch en Allemagne. En 1883, Ogston leur a donné le nom de *Staphylococcus*, dérivé des termes grecs Staphylé (grappe de raisin) et Kokkos (grain).

La classification des staphylocoques a connu de nombreuses modifications au fil du temps. Dans la première édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" en 1923, ils étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae*. Puis, en 1926, lors de la deuxième édition, ils ont été reclassés dans la famille des *Micrococcaceae*. En 1948, cette famille comprenait à la fois les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*. Ce n'est qu'en 1957 que ces deux genres ont été séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant, cette distinction a entraîné une certaine confusion, certaines espèces ayant été attribuées au mauvais genre. Ce n'est qu'en 1974 que Baird-Parker a définitivement différencié *Staphylococcus* et *Micrococcus*, en s'appuyant sur la teneur en guanine et cytosine de leur ADN (66-75% pour *Micrococcus* contre 30-39% pour *Staphylococcus*). En 2001, grâce à l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et d'autres études génétiques, Garrity et ses collègues ont proposé de retirer le genre *Staphylococcus* de la famille des *Micrococcaceae* (qui comprend *Micrococcus* et *Stomatococcus*) pour le placer dans une famille distincte : *Staphylococcaceae*. Cette famille inclut plusieurs genres, notamment *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrooccus*, et surtout *Staphylococcus*, le plus important du groupe (**Dworkinet al., 2006**). La classification des espèces de staphylocoques repose principalement sur la production de la coagulase libre, une enzyme impliquée dans la coagulation du sérum humain. Ainsi, on distingue sept espèces et sous-espèces coagulase-positives, dont *S. aureus*, et quarante-six coagulase-négatives (**Le Loir et Gantier, 2010**).

1.2. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif déposés en amas. Actuellement, on distingue 44 espèces. L'espèce *Staphylococcus aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré) se distingue généralement des autres staphylocoques par la présence d'une coagulase. *S. aureus* est un germe très important aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales (**Winnetal., 2002**).

1.2.1. Classification phylogénique

D'après la 9^{ème} édition du **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** *Staphylococcus aureus* est classé ainsi:

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre: *Staphylococcus*

Espèce: *Staphylococcus aureus*

1.2.2. Habitat

Le réservoir naturel des staphylocoques est constitué de l'homme et des animaux à sang chaud. En tant que commensaux occasionnels ou permanents. Ces bactéries colonisent la peau et les muqueuses humaines et animales avec une localisation principale dans la partie antérieure du nez (**Kluytmans et al., 1997**). Le taux de portage nasal chez les individus sains varie entre 20% et 55%, selon la population étudiée (**Nouwen et al., 2001**).

Staphylococcus aureus se distingue par sa grande capacité d'adaptation et de résistance au stress, ce qui lui permet de survivre dans divers environnements. La bactérie peut être isolée sporadiquement dans des milieux tels que le sol, l'eau douce, le sable de plage, l'eau de mer et les surfaces végétales. Elle est particulièrement présente dans les poussières en suspension dans l'air et sur les surfaces (**Dworkin et al., 2006**).

1.2.3. Description et Critères d'identification de *Staphylococcus aureus*

1.2.3.1. Caractères morphologiques

À l'examen microscopique, *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme de cocci sphériques à coloration de Gram positive, et non sporulé. Cette bactérie s'organise en amas polyédriques irréguliers, rappelant une "grappe de raisin" (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). Cette disposition résulte de leur division en trois plans perpendiculaires successifs, associée à une séparation incomplète des cellules filles de leur cellule mère (**Touaitia, 2016**).

La majorité des souches possèdent une capsule in vivo, bien qu'elles la perdent progressivement en culture. Certaines souches forment des colonies mucoïdes entourées d'une

pseudocapsule (Fauchere et Avril, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004).

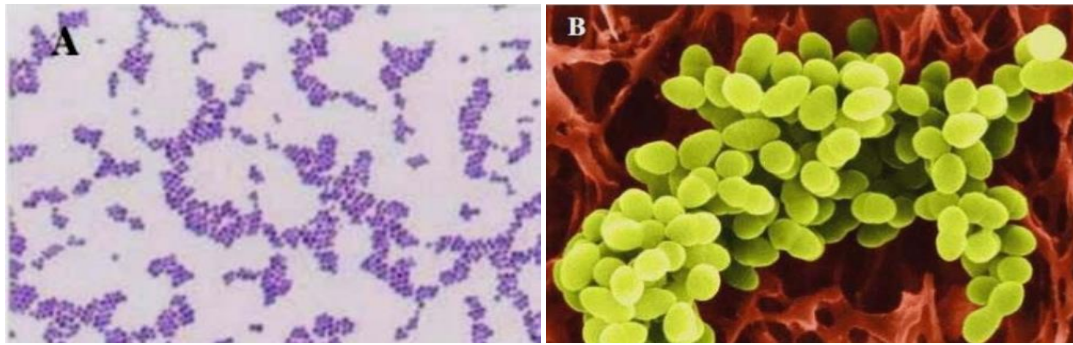


Figure N° 1: Aspect morphologique de *S.aureus* en microscope optique (A) (X1000) et en microscope électronique (B) (X15000) (El-Anzi, 2014).

1.2.3.2. Caractères cultureux

Staphylococcus aureus est une bactérie peu exigeante, capable de croître sur divers milieux en conditions aérobies et anaérobies, avec une intervalle de température de 7°C à 48,5°C (optimum 30-37 °C) et un pH de 4,2 à 9,3 (optimum 7-7,5). Il tolère jusqu'à 10% de NaCl, lui permettant de coloniser divers aliments (Guiraud et Rosec, 2004 ; Bhatia et Zahoor, 2007).

En milieu liquide, la culture est rapide, formant un trouble homogène puis un dépôt, sans production de pigment (Ananthanarayan et Paniker, 2006).

Sur milieux solides, après 24h d'incubation, les colonies sont larges (2-4 mm), bombées, lisses et brillantes, avec une couleur variant du blanc au jaune orangé (Denis *et al.*, 2007).

Sur gélose au sang, elles sont jaune dorées et entourées d'une hémolyse bêta (Couture, 1990). En milieu sélectif, gélose Chapman (7,5% NaCl + mannitol) favorise la croissance de *S. aureus*, dont les colonies sont entourées d'un halo jaune après fermentation du mannitol.

Sur milieu Baird-Parker, *S. aureus* apparaît sous forme de colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo clair (activité protéolytique) (Ananthanarayan et Paniker, 2006 ; Denis *et al.*, 2007).

1.2.3.3. Caractères biochimiques

Staphylococcus aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultative, catalase positive et oxydase négative. Il se caractérise par son incapacité à produire de l'indole et de l'acétone. De plus, il peut réduire le téllurite de potassium ainsi que les nitrates en nitrites et hydrolyser l'arginine en libérant de l'ammoniaque (Denis *et al.*, 2007). Parmi ses caractéristiques distinctives, *S. aureus* produit une coagulase libre et un pigment caroténoïde jaune doré, à l'origine de son nom de "staphylocoque doré". Il possède également une Dnase et exprime la protéine A au niveau de sa paroi cellulaire (Winnet *et al.*, 2006).

1.3. Facteurs de virulence

Staphylococcus aureus possède plusieurs facteurs de virulence lui permettant d'échapper aux défenses de l'hôte, notamment des enzymes (hémolysines, nucléases, protéases) facilitant l'invasion des tissus et l'acquisition de nutriments. Il produit également des toxines comme la TSST-1 et les entérotoxines, qui affectent le système immunitaire et sont considérées comme des superantigènes. Cette diversité de facteurs de virulence est contrôlée tout au long de la croissance par un réseau complexe de régulateurs, dont le plus étudié et le principal est appelé Agr (Accessory Gene Regulator), activant d'abord les gènes d'adhésion, puis ceux des toxines (Dufour *et al.*, 2002 ; Bronner *et al.*, 2004).

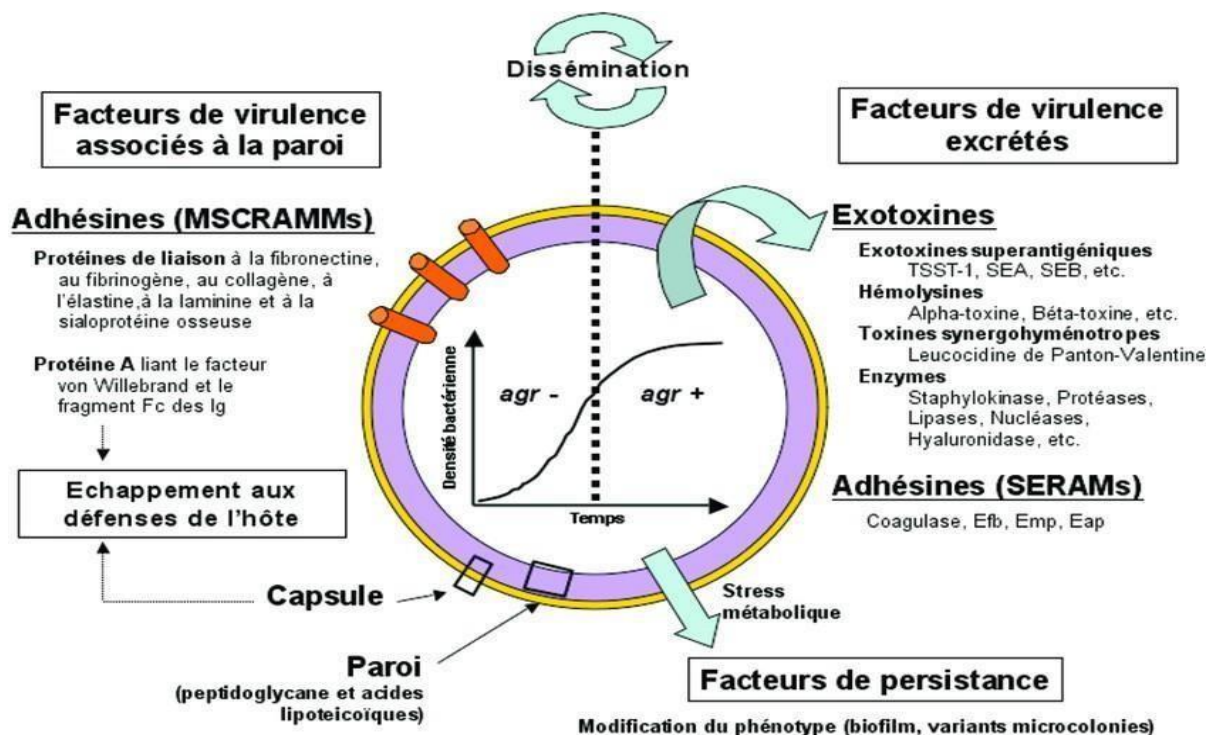


Figure N° 2: Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par *S.aureus* (Bronner *et al.*, 2003).

1.3.1. Les protéines de surface

1.3.1.1. Les facteurs d'adhésion

Ces protéines bactériennes sont appelées MSCRAMM, acronyme de « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules ». *Staphylococcus aureus* exprime ces protéines à sa surface afin de faciliter l'adhésion à certaines molécules de l'hôte telles que la fibronectine, la laminine et le collagène, qui constituent la matrice extracellulaire des surfaces épithéliales et endothéliales (Clarke *et al.*, 2006 ; Foster, 2013).

a. La protéine A

Cette protéine, spécifique à l'espèce *Staphylococcus aureus*, possède une masse moléculaire de 42 kDa et un point isoélectrique de 5,1. Elle est un composant constitutif de la paroi bactérienne et demeure insoluble à l'état natif. Plus de 90 % des souches humaines (biotype A) produisent cette protéine (Baggett *et al.*, 2004).

b. La protéine de liaison au collagène

La protéine CNA constitue un facteur de virulence impliqué dans l'arthrite septique et joue un rôle important dans la progression des infections bactériennes. Elle permet aux bactéries de s'ancrer solidement aux structures tissulaires contenant son ligand, notamment en se liant à la protéine C1q du complément, ce qui bloque l'activation de la voie classique du complément. Par ailleurs, la CNA contribue également à la virulence de plusieurs infections causées par *Staphylococcus aureus*, telles que les kératites, les ostéomyélites et les mammites. Ces observations soulignent que la capacité de cette protéine à interagir avec le collagène confère un avantage notable aux bactéries dans le processus de la pathogénèse (Patti *et al.*, 1994 ; Herman-Bausier *et al.*, 2016 ; Paharik *et al.*, 2016 ; Madani *et al.*, 2017).

c. La protéine de liaison à la fibronectine

Joue un rôle clé dans l'adhérence de *Staphylococcus aureus* aux caillots plasmatiques ainsi qu'aux biomatériaux en contact prolongé avec le sang. Cette interaction contribue à la survenue d'infections liées à la présence de corps étrangers et met en évidence la virulence de la bactérie dans les infections ostéo-articulaires (Batiard *et al.*, 2007).

d. La protéine de liaison au fibrinogène

Également appelée clumping factor, est une protéine de surface qui favorise l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle joue un rôle clé dans la virulence des infections, notamment au niveau des plaies et des dispositifs médicaux implantés (**Bnonneret *al.*, 2004**).

1.3.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose

a. La paroi

Est constituée de peptidoglycane, ainsi que d'acides teichoïques et lipoteichoïques. Les acides teichoïques sont des polymères linéaires de ribitol phosphate, fixés de manière covalente au peptidoglycane. Ils possèdent une activité similaire aux endotoxines, favorisant la sécrétion de cytokines par les cellules lympho-monocytaires, l'activation du complément et l'agrégation plaquettaire. De plus, les acides teichoïques servent de récepteurs aux bactériophages et induisent la production d'anticorps détectables dans le sérum des patients, un phénomène exploité dans la lysotypie des staphylocoques (**Majcherczyk *et al.*, 2003**).

b. La capsule

Les polysaccharides capsulaires permettent de classer *Staphylococcus aureus* en 11 sérotypes, dont les sérotypes 5 et 8 sont les plus fréquemment rencontrés dans les pathologies humaines. Ces structures contribuent à inhiber la phagocytose et favorisent l'adhérence de la bactérie aux cellules (**Becker, 2018**).

1.3.3. Les exoenzymes

a. Coagulase libre

Également connue sous le nom de staphylocoagulase. Cette protéine extracellulaire thermostable est une caractéristique des souches de *Staphylococcus aureus*, bien qu'elle soit également présente chez *S. delphini*, *S. intermedius* et *S. hyicus* (**Langlet *et al.*, 1992**). Elle provoque la coagulation du plasma humain ou de lapin même en l'absence d'ions calcium (Ca^{2+}), comme dans les échantillons traités avec des anticoagulants (**Avril *et al.*, 1992**). Cette enzyme forme avec la prothrombine plasmatique un complexe appelé staphylothrombine, qui transforme le fibrinogène en fibrine (**Peacock, 2006**).

b. Hyaluronidase

Il s'agit d'une enzyme extracellulaire thermolabile qui dégrade l'acide hyaluronique, facilitant ainsi la diffusion de *S. aureus* dans les tissus (Makris *et al.*, 2005). Sa production est limitée à la phase exponentielle de croissance bactérienne (Poncholi, 2002).

c. Staphylokinase

C'est une glycoprotéine composée de 136 acides aminés, sécrétée par certaines souches de *S. aureus* (Alessi, 2000). Elle forme un complexe avec le plasminogène (Deverrière *et al.*, 2007), facilitant sa conversion en plasmine, une protéase fibrinolytique (Jin *et al.*, 2004). Cette enzyme joue un rôle dans la formation des embolies septiques (Avril *et al.*, 1992).

d. Catalase

Cette enzyme empêche la formation de radicaux oxygénés toxiques, ce qui inhibe la capacité bactéricide intracellulaire des leucocytes (Peacock, 2006).

e. Protéases

Présentes chez *S. aureus*, ces enzymes regroupent les métalloprotéases, les sérine-protéases et les thiolprotéases (Arvidson, 1973 ; Drapeau, 1978). Elles contribuent à la protection de la bactérie en dégradant certains peptides antimicrobiens cationiques tels que la cathelicidine LL-17, produite par les neutrophiles et les kératinocytes (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004).

1.3.4. Toxines

Les souches de *S. aureus* sécrètent un grand nombre de toxines. Elles sont résumées dans le tableau 1

Tableau N° 1: Toxine simpliquées dans la virulence de *S.aureus* (Vincenot *et al.*, 2008).

Familles	Principales toxins	Mécanismes d'action
Toxines super Antigéniques	- Toxine du choc toxique staphylococcique - Entérotoxines A à E, G, I à U	- Choc toxique staphylococcique par activation du système immunitaire et libération de cytokines inflammatoires - Réaction auto-immune - Intoxication alimentaire
Toxines formant des pores	- Toxines à hélice alpha - Alpha-hémolysine - Gamma-hémolysine - Leucocidine de Panton-Valentine	- Destruction des cellules de défense de l'hôte par formation de pores au niveau des membranes cellulaires
Toxines à activité protéolytique	- Exfoliatines	- Syndrome d'exfoliation généralisé - Impétigo bulleux staphylococcique

1.4. Pouvoir pathogène

L'espèce *Staphylococcus aureus* se divise en deux sous-espèces:

- *S. aureus* subsp. *anaerobius* : une bactérie catalase négative, pathogène principalement chez les animaux.
- *S.aureus* subsp. *aureus* : pathogène chez l'homme, elle se distingue par sa virulence (production de protéines de surface et d'enzymes comme la coagulase libre et la thermonucléase) ainsi que par sa capacité toxigène (production de toxines, notamment des entérotoxines de types antigéniques A à F) (Dolarras, 2007).

Staphylococcus aureus peut provoquer une large gamme d'infections:

➤ **Infections pulmonaires**, notamment les embolies septiques et les pneumopathies d'aspiration.

- **Infections de la peau et des tissus mous**, telles que les furoncles, les abcès, les infections de plaies (qu'elles soient traumatiques ou chirurgicales), la cellulite, ainsi que l'impétigo (également causé par les streptocoques).
- **Bactériémies**, souvent associées à des abcès métastatiques.
- **Endocardites**, atteignant les valves cardiaques.
- **Infections du système nerveux central**, incluant les abcès cérébraux, les méningites (rares), et les abcès épiduraux.
- **Infections ostéo-articulaires**, telles que l'ostéomyélite et l'arthrite septique.
- **Infections du tractus génito-urinaire**, notamment les abcès rénaux et les infections urinaires basses.
- **Maladies liées à la production de toxines**, comme le syndrome du choc toxique et les intoxications alimentaires (gastroentérites) (Schaechter *et al.*, 1999).

1.5. Résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

La résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques a conduit à des résistances vis-à-vis de presque tous les antibiotiques commercialisés destinés à lutter contre les staphylocoques. Les mécanismes responsables de cette résistance incluent la production d'enzymes inactivatrices, la modification des cibles des antibiotiques, ainsi que des systèmes d'efflux qui réduisent la concentration de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie (Pantosti *et al.*, 2007).

1.5.1. Résistance à la pénicilline

La résistance à la pénicilline chez *S. aureus* est médiée par le gène *blaZ*, qui code pour la β -lactamase. Cette enzyme, principalement extracellulaire, est produite lorsque *S. aureus* est exposé aux antibiotiques β -lactamines, et elle hydrolyse l'anneau β -lactame, rendant l'antibiotique inefficace. L'expression du gène *blaZ* est régulée par deux gènes adjacents : l'antirépresseur *blaR1* et le répresseur *blaI*. Des études ont montré que le processus de synthèse de la β -lactamase nécessite le clivage séquentiel de ces protéines régulatrices. Lorsque *S. aureus* est exposé aux β -lactamines, BlaR1, une protéine transmembranaire capteur-transducteur, se clive elle-même (Holmes *et al.*, 2011). Les chercheurs émettent l'hypothèse que cette protéine clivée fonctionne comme une protéase, qui clive ensuite BlaI, permettant ainsi la synthèse de la β -lactamase. Une protéine supplémentaire, BlaR2, pourrait également être impliquée dans cette voie de signalisation (Foster, 2017).

1.5.2. Résistance à la méticilline

Les staphylocoques peuvent résister à la méticilline par divers mécanismes, dont le plus courant repose sur la modification de la cible des antibiotiques β -lactamines.

La méticilline, tout comme l'oxacilline et la cloxacilline, appartient au groupe des pénicillines M, qui ne sont pas dégradées par les pénicillinases. La résistance à la méticilline, qui induit une résistance généralisée à l'ensemble des β -lactamines, est liée à un gène chromosomique appelé *mecA*. Ce gène code pour une protéine de liaison aux pénicillines supplémentaire, la PLP2a, ayant une faible affinité pour les β -lactamines, en particulier la méticilline. Ce mécanisme est observé chez *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ainsi que chez les staphylocoques à coagulase négative (Dumitrescu *et al.*, 2010).

La résistance induite par le gène *mecA* peut se manifester de deux façons:

Homogène (résistance de haut niveau): toutes les bactéries d'une souche expriment la résistance.

Hétérogène (résistance de bas niveau): seule une partie des colonies filles d'une même souche exprime la résistance. Cette forme est la plus fréquente et constitue un indicateur fort de la présence du gène *mecA* (Hamdad *et al.*, 2006).

1.5.3. Résistance à la vancomycine

Les glycopeptides, comme la vancomycine, ciblent le résidu *D-Ala-D-Ala* du peptidoglycane. Les souches hétéro-VISA et VISa présentent une résistance hétérogène liée à un épaissement de la paroi bactérienne, qui piège les antibiotiques dans les couches superficielles et les empêche d'atteindre leur cible intracellulaire (Hiramatsu, 2001).

1.5.4. Autres mécanismes de résistance

Les aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) inhibent la synthèse des protéines. La résistance à ces antibiotiques est généralement due à la modification des cibles ribosomales par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables. On distingue trois phénotypes de résistance (Bismuth et Leclercq, 2000 ; Quinampoix et Mainardi, 2001).

- Phénotype K: résistance à la kanamycine et à l'amikacine.
- Phénotype KT: résistance à la kanamycine, l'amikacine et la tobramycine.
- Phénotype KTG : résistance à la kanamycine, l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine.

Chapitre2
Biofilms chez *Staphylococcus*
aureus

2. Biofilms chez *Staphylococcus aureus*

2.1. Présentation de biofilm

Certaines bactéries, comme *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, peuvent s'agréger pour former un biofilm. Ce phénomène est courant et observé chez plus de 80 % des micro-organismes vivants, par opposition à l'état planctonique (Yong *et al.*, 2019).

Anthony van Leeuwenhoek est reconnu comme le découvreur du biofilm, après avoir observé l'attachement des micro-organismes sur la surface de ses dents. Le terme « biofilm » est défini comme une communauté microbienne sessile de manière irréversible. C'est un ensemble de cellules, formé de la même espèce, d'espèces différentes ou de types différents, qui forment une communauté, associés entre eux à des surfaces biotiques ou abiotiques. L'adhérence de ces cellules à une surface est marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive, protectrice, polymérique extracellulaire d'origine microbienne (Itohet *al.*, 2015).

Le biofilm est impliqué dans plusieurs problématiques, telles que les infections bactériennes chroniques, la contamination des dispositifs médicaux, la dégradation de la qualité de l'eau et la contamination des aliments. L'adhésion des cellules à une surface leur confère de nombreux avantages, notamment une protection contre les agents antimicrobiens et constitue une barrière contre les défenses immunitaires de l'hôte (Zaferet *al.*, 2024).

2.2. La composition de matrice du biofilm

Un biofilm est une structure complexe formée de cellules bactériennes enchâssées dans une matrice auto-produite de polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations (Ratheet *al.*, 2021). La matrice du biofilm est principalement composée d'eau, pouvant en contenir jusqu'à 97%. La composition exacte de cette matrice peut varier en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales. Cette matrice extracellulaire agit comme une barrière physique, limitant la pénétration des antibiotiques et réduisant leur efficacité (Costerton *et al.*, 1999).

Un des principaux exopolysaccharides présents dans le biofilm est un polymère de β-1,6-N-acétyl-D-glucosamine, aussi appelé polyglucosamine, PGA ou PNAG. Ce polymère est couramment trouvé chez plusieurs espèces bactériennes, telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Yersinia pestis*.

Lacelluloseestégalement fréquemment observée dans diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. D'autres polysaccharides, comme le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate chez *Pseudomonas*, peuvent également être présents (Limoliet *al.*, 2015).

2.3. Les étapes de formation de biofilm

La formation des biofilms par les bactéries semble être déclenchée par des pressions environnementales (Annouset *al.*, 2009), telles qu'un déficit en oxygène ou en nutriments, ou encore en réponse à un traitement (Vu *et al.*, 2009).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande diversité de surfaces, qu'ils agissent de tissus vivants, de dispositifs médicaux ou de supports présents dans le sol et les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes majeures dans le processus de formation d'un biofilm (Talaro, 2008).

2.3.1. Adhérence réversible

En milieu aqueux ou dans des conditions d'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent des surfaces solides par divers mécanismes, notamment le mouvement brownien, la sédimentation ou une mobilité active rendue possible par la présence de flagelles (Høiby *et al.*, 2011). Elles s'attachent alors de manière réversible grâce à des interactions physico-chimiques non spécifiques, telles que les forces électrostatiques ou électrodynamiques.

Cette étape est modulée par divers facteurs environnementaux, notamment le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments, ainsi que les caractéristiques d'écoulement du fluide environnant. La nature de la surface joue également un rôle crucial (Beloinet *al.*, 2008).

2.3.2. Adhérence irréversible

La fixation devient irréversible lorsque les bactéries commencent à produire des exopolysaccharides (Høiby, 2011). De plus, cette stabilité accrue est assurée par la présence de structures d'adhérence spécifiques, variables selon les espèces bactériennes. Chez *Escherichia coli*, par exemple, les fimbriae et les curli interagissent avec des récepteurs spécifiques situés à la surface du support (Beloinet *al.*, 2008.)

2.3.3. Croissance et maturation du biofilm

Lorsque les forces d'attraction entre les bactéries et la surface deviennent plus fortes que celles provoquant la répulsion, certaines bactéries s'attachent de manière irréversible, prolifèrent et forment une fine couche. C'est à ce moment que débute la synthèse de lamatrice extracellulaire. Le contact avec la surface colonisée déclenche l'expression de nouveaux gènes, favorisant la production de facteurs permettant aux bactéries de devenir sessiles et stabilisant le biofilm, comme la formation de la matrice. De plus, d'autres micro-organismes viennent se joindre au biofilm, créant un film tridimensionnel hétérogène composé de plusieurs couches. Les microcolonies formées se développent également, devenant des macrocolonies (Tolker-Nielsen, 2015).

2.3.4. Le détachement

Cette étape permet aux bactéries de se séparer, soit individuellement, soit sous forme d'amas, et de devenir planctoniques, ce qui facilite leur dispersion dans le milieu. Ce phénomène peut être déclenché par un manque de nutriments dans le biofilm, des modifications environnementales telles que des variations de l'oxygénation, la présence de substances toxiques, la dégradation de la matrice, ou encore par le phénomène de quorum sensing (QS). Une fois détachées, ces bactéries peuvent infecter de nouveaux sites, former de nouveaux biofilms et entraîner des infections chroniques récurrentes (Guilhenet *al.*, 2017).

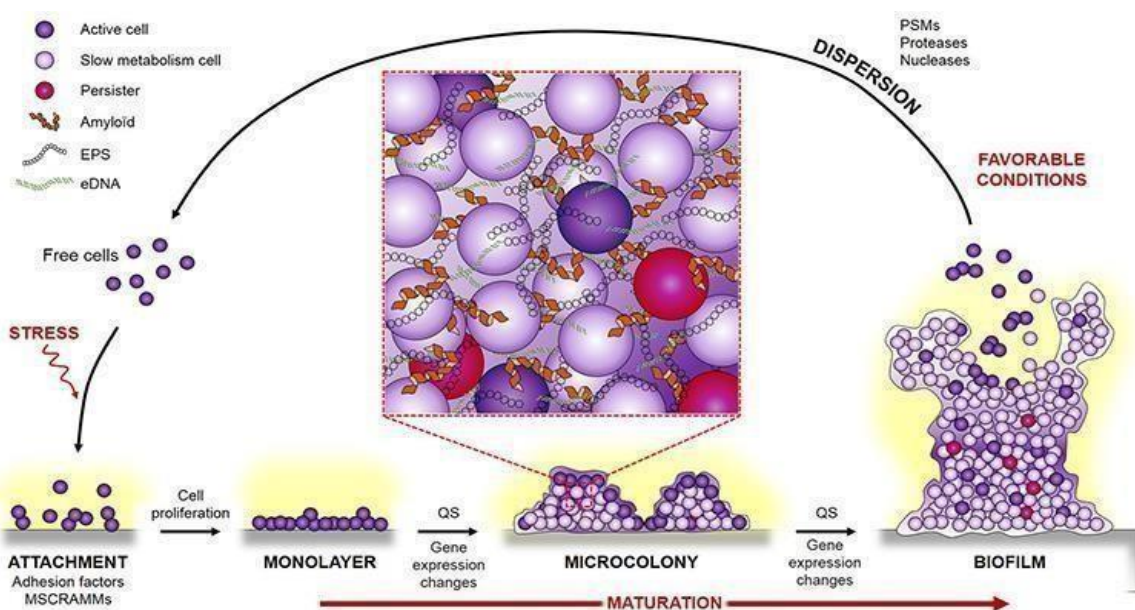


Figure N° 3: Les étapes de formation de biofilm (Teodósio *et al.*, 2013).

2.4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs. Parmi eux figurent les caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries se fixent, les forces physiques présentes dans le milieu, les conditions environnementales, ainsi que les propriétés de surface des cellules bactériennes (**Donlan, 2002**).

2.4.1. Caractéristiques de la surface

Tout matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries peut constituer un support favorable à la formation d'un biofilm. Des facteurs tels que la rugosité de la surface, ses propriétés chimiques, ou encore la présence préalable de films protéiques, influencent fortement l'adhésion bactérienne (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009**).

2.4.2. Caractéristiques du milieu

Des éléments comme la température, le pH, les conditions hydrodynamiques du fluide, la concentration de certains cations, la disponibilité en nutriments et en sources de carbone, ainsi que les concentrations en oxygène, en fer et l'osmolarité du milieu, jouent un rôle clé dans l'adhésion et le développement du biofilm (**Mahami et Adu-Gyamfi, 2011**).

2.4.3. Propriétés cellulaires

Plusieurs caractéristiques des cellules bactériennes influencent leur capacité d'adhésion aux surfaces, notamment l'hydrophobicité de leur membrane, la présence de fimbriae et de flagelles, ainsi que la production d'exopolysaccharides. En particulier, une surface cellulaire hydrophobe favorise l'interaction avec des matériaux peu polarisés, renforçant ainsi les liaisons hydrophobes entre la cellule et le substrat (**Donlan, 2002**).

2.5. Les infections associées aux biofilms de *Staphylococcus aureus*

La formation de biofilm est particulièrement pertinente dans le cadre des infections liées aux dispositifs médicaux (IOA) (**Omwenga et Awuor, 2024**). En effet, le biofilm est responsable de plus de 80 % de ces infections, qui comprennent l'endocardite, l'ostéomyélite, les infections de la peau et des tissus mous, les infections urinaires, la colonisation nasale, les complications liées à la fibrose kystique et les infections associées aux implants (**Lebeaux et al., 2024**). Dans de nombreux cas, la production de biofilm contribue à la chronicité des infections à *S. aureus*. L'un des problèmes les plus importants est la colonisation des

dispositifs médicaux implantés par des biofilms staphylococciques, ce qui représente un risque majeur pour la santé. Les biofilms peuvent se former sur une variété de dispositifs médicaux tels que les cathéters, les articulations prothétiques, les valves cardiaques prothétiques, les lentilles de contact, les shunts de liquide céphalorachidien et les stimulateurs cardiaques. Une fois implantés, ces dispositifs sont rapidement recouverts de protéines de l'hôte, ce qui facilite l'attachement de *S.aureus* et favorise la formation de biofilm (Omwenga et Awuor, 2024).

Le traitement des infections sur dispositifs médicaux reste complexe, car une simple antibiothérapie ne suffit généralement pas à éradiquer le biofilm formé. C'est pourquoi une prise en charge chirurgicale est souvent nécessaire en complément. La prévention de la formation de biofilm est également cruciale, et cela passe par des mesures stériles lors de la pose de prothèses ainsi qu'une antibioprophylaxie efficace pendant l'intervention (Agarwalla et al., 2020).

2.6. Résistance du biofilm

La présence du biofilm rend l'élimination de la bactérie par les défenses immunitaires de l'hôte et par les antibiotiques particulièrement difficile

2.6.1. Résistance du biofilm aux antibiotiques

La capacité de *Staphylococcus aureus* à former des biofilms constitue un facteur clé de sa persistance dans l'organisme et de sa résistance aux traitements antibiotiques. De plus, à l'intérieur du biofilm, les bactéries présentent un métabolisme ralenti, ce qui les rend moins sensibles aux agents antimicrobiens ciblant les cellules en division active (Stewart et Costerton, 2001). À un niveau moléculaire, *S. aureus* active des systèmes de régulation spécifiques comme le système agr (*accessory gene regulator*), qui module l'expression de facteurs de virulence et influence la maturation et la dispersion du biofilm (Yarwood et Schlievert, 2003). Par ailleurs, des mutations adaptatives et la production accrue de pompes d'efflux contribuent également à l'augmentation de la tolérance aux antibiotiques au sein du biofilm (Soto, 2013). Ces mécanismes combinés rendent les infections associées aux biofilms particulièrement difficiles à éradiquer, nécessitant souvent des traitements prolongés, l'utilisation de fortes doses d'antibiotiques, voire le retrait des dispositifs médicaux contaminés.

Les biofilms montrent également une tolérance accrue aux antibiotiques : cette résistance transitoire serait liée soit à la réduction de la diffusion des antibiotiques par la

matrice (Boles et Horswill, 2011), soit à la formation de cellules dormantes dites « persister cells » (Lewis, 2010). La matrice du biofilm constitue une barrière limitant l'accès des antibiotiques aux couches internes. De plus, la faible disponibilité en oxygène et en nutriments au centre du biofilm renforce la résistance, notamment vis-à-vis des aminoglycosides (Lewis, 2010).

2.6.2. Résistance de biofilm aux systèmes immunitaires

Les biofilms représentent un défi majeur pour le système immunitaire, notamment dans les infections chroniques, en raison de plusieurs mécanismes de défense (Zaferet *et al.*, 2024) :

- **Barrière physique** : La matrice extracellulaire agit comme un bouclier qui empêche les cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles) et les molécules antimicrobiennes (anticorps, complément) d'atteindre les bactéries (Tomlin, et Piccinini, 2018).
- **Réduction de la reconnaissance immunitaire** : Les bactéries peuvent modifier ou camoufler leurs structures de surface, ce qui rend leur détection par le système immunitaire plus difficile (Van Avondt *et al.*, 2015).
- **Neutralisation des défenses immunitaires** : Certaines bactéries produisent des enzymes capables de dégrader les anticorps ou les composants du complément (Kilian *et al.*, (1983).
- **Métabolisme réduit** : À l'intérieur du biofilm, certaines bactéries entrent en état de dormance, ce qui les rend moins vulnérables aux attaques, car les cellules immunitaires ciblent principalement les bactéries en activité (Khan *et al.*, 2020).
- **Perturbation de la réponse immunitaire locale** : Le biofilm peut interférer avec les signaux inflammatoires, réduisant ainsi le recrutement et l'efficacité des cellules immunitaires au site de l'infection (Moser *et al.*, 2017).

2.7. Système de régulation simplifié dans la formation de biofilm

La formation de biofilm est un comportement collectif strictement régulé par plusieurs systèmes (Tolker-Nielsen, 2015).

2.7.1. Quorum Sensing

Le quorum sensing est un système de communication bactérien basé sur la détection de la densité cellulaire à travers des molécules signal appelées autoinducteurs. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, certains gènes sont activés, modulant ainsi des processus comme la formation de biofilm, la virulence et la résistance aux antibiotiques (**Abisado et al., 2018**).

Chez *Staphylococcus aureus*, deux systèmes de quorum sensing jouent un rôle dans la régulation du biofilm :

Le système Agr et le système LuxS/AI-2. Le système Agr favorise la dispersion du biofilm en activant RNAIII, tandis que LuxS/AI-2 réduit la production de la substance d'adhésion PIA.

Le locus *agr* code un système complexe activé par un peptide autoinducteur (AIP). Ce système comprend deux unités de transcription contrôlées par les promoteurs P2 et P3. Le promoteur P2 génère RNAII, qui code pour les protéines AgrA, AgrB, AgrC et AgrD, impliquées dans la synthèse, la transformation et la détection de l'AIP. Lorsque l'AIP atteint un seuil critique, il active le capteur AgrC, qui déclenche une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation du promoteur P3 et à la production de RNAIII, régulant ainsi les gènes liés au biofilm (**Boles et Horswill, 2008**).

RNAIII, molécule clé du système de quorum sensing, régule les gènes de toxines et influence la formation de biofilms en inhibant un répresseur et réduisant l'expression d'adhésines de surface. Un niveau élevé d'AIP favorise la dépolymérisation des biofilms de *S. aureus* grâce à la sécrétion de protéases. La production de PSMs est contrôlée par AgrA et son activation stimule la maturation et la propagation du biofilm. De plus, le glucose inhibe le promoteur P3 et après consommation, active le système Agr, facilitant la diffusion du biofilm. Plusieurs systèmes régulateurs interagissent avec Agr pour gérer les réponses environnementales et la formation des biofilm (**Bronesky et al., 2016**).

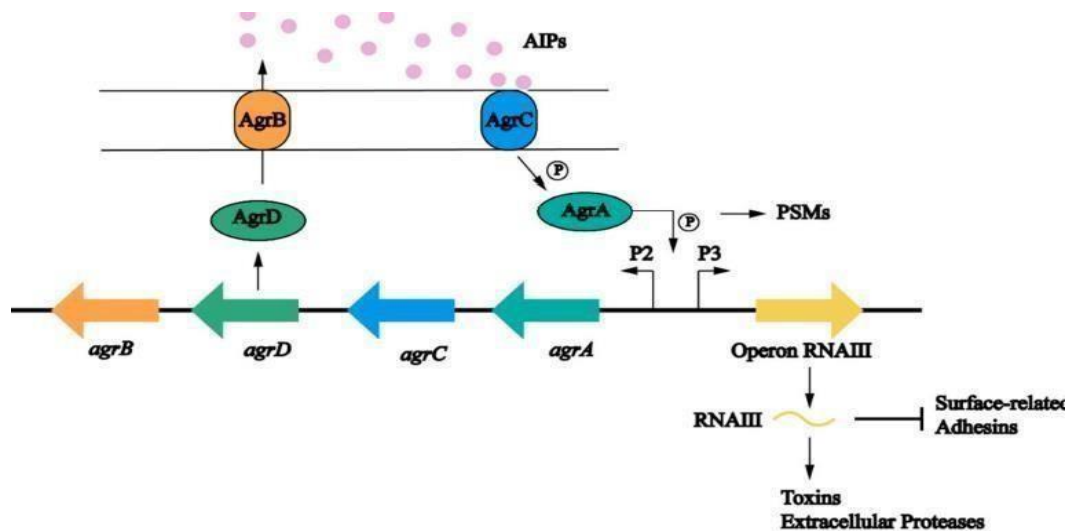


Figure N° 4: Le rôle du système de quorum sensing Agr dans la formation du biofilm chez *S. aureus* (Boles et Horswill, 2008).

Le système LuxS/AI-2 est un système de signalisation inter-espèces partagé entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, régulant la formation du biofilm via la molécule AI-2. Chez *Staphylococcus aureus*, LuxS agit comme un inhibiteur de la formation du biofilm en activant *icaR* et en réprimant *icaA* (Yu *et al.*, 2012). Il influence également le gène *rbf*, ce qui réduit la production de PIA. Cependant, l'effet de l'AI-2 varie selon le type de bactérie et sa concentration. Quant au régulateur global *SarA*, il est essentiel pour l'activation des gènes responsables de la production du biofilm et de nombreux facteurs de virulence (Ahmed *et al.*, 2019).

2.7.2. Système Régulateur à Deux Composants

Le système SrrAB est essentiel pour la régulation de *S. aureus* dans des environnements hypoxiques, influençant la production de toxines et la formation de biofilm. Il détecte l'oxygène via la kinase SrrB et active SrrA, qui régule des gènes comme *icaA* impliqués dans la production de PIA. D'autres systèmes comme SaeRS et LytSR jouent également un rôle dans la formation de biofilm en régulant les protéines d'adhésion et la mort cellulaire. ArlRS et MgrA contribuent également à la régulation du biofilm, influençant l'expression de protéines comme PNAG (Yarwood *et al.*, 2001).

2.7.2.1. Le deuxième messager

Les dinucléotides cycliques, tels que le c-di-GMP et le c-di-AMP, sont des molécules de signalisation cruciales pour la régulation de la motilité, la formation de biofilm et l'expression

des gènes de virulence chez les bactéries. Le c-di-GMP est synthétisé par les diguanosylcyclases (DGCs) et dégradé par les phosphodiesterases (PDEs), influençant la transition entre mouvement libre et formation de biofilm, notamment en réduisant l'activité des flagelles et en augmentant la production de polysaccharides. Le c-di-AMP, quant à lui, joue un rôle similaire dans la régulation du biofilm chez *Staphylococcus aureus*, avec des variations selon les souches bactériennes. Il est aussi impliqué dans la libération d'eDNA et la biosynthèse des purines, affectant la persistance de l'infection (**Ha et O'Toole, 2015**).

2.7.2.2. sARNs

Les petits ARN non codants (sARNs) sont essentiels dans la régulation génique, notamment dans la formation de biofilm. Ils agissent en interagissant avec les ARNm cibles ou les protéines régulatrices, affectant positivement ou négativement la synthèse de protéines. Par exemple, le sARNRsaA inhibe la synthèse de MgrA et favorise la formation de biofilm, tandis que le sARNRsaF, en se liant à certaines protéines, augmente également cette formation. Le sARNRsaI inhibe la formation de biofilm en se liant à l'ARNm de *icaR*, régulant ainsi la production de composants du biofilm (**Bronesky et al., 2019**).

Chapitre3

Les huiles essentielles de *Mentha pulegium*

3. Les huiles essentielles de *Mentha pulegium*

3.1 Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont des végétaux appréciés pour leurs arômes et leurs saveurs particulières. Elles occupent une place importante en cuisine, où elles servent à relever le goût des plats, mais sont également utilisées en phytothérapie pour leurs bienfaits sur la santé (Sarker *et al.*, 2013).

Parmi les espèces les plus répandues, on peut citer le basilic, le thym, le romarin, la menthe, le persil ou encore l'ail. Leur culture est généralement simple et accessible, même pour les jardiniers débutants. Beaucoup de ces plantes peuvent être cultivées en pot, sur un balcon ou un rebord de fenêtre, ce qui les rend idéales pour les espaces urbains (Anwar, 2020).

Ces plantes aromatiques constituent la principale source des huiles essentielles, qui sont obtenues à partir de leurs parties aromatiques telles que les feuilles, les fleurs, les graines ou les racines. Les huiles essentielles enferment des composés volatils responsables de leur odeur et de leurs propriétés thérapeutiques (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

3.2. Les huiles essentielles

3.2.1. Historique

Depuis l'Antiquité, l'homme a cherché à isoler les composés huileux contenus dans les matières aromatiques. Ce but a été atteint en soumettant ces matières à la chaleur, ce qui permettait de transformer les substances aromatiques en vapeur, qu'il suffisait ensuite de recueillir et de condenser pour obtenir un liquide.

Ce procédé, réalisé à feu nu, a été nommé « distillation ». Il semble que cette technique était déjà connue des civilisations chinoise et indienne aux alentours de 2000 ans avant J.-C. Les Égyptiens et les Arabes ont exploité les propriétés médicinales et aromatiques des plantes dans divers domaines : la conservation des momies, l'aromatisation des bains, la désinfection des plaies à l'aide d'onguents, ainsi que la fabrication de parfums et de boissons aromatisées (Möller, 2008).

3.2.2. Définition d'huile essentielle

L'huile essentielle est définie comme un mélange naturel complexe composé de métabolites secondaires lipophiles, volatils, aromatiques et généralement liquides, présents dans des structures végétales spécialisées (Bruneton, 1993 ; Kalemba et Kunicka, 2003). D'après la norme AFNOR NF T 75-006, une huile essentielle est obtenue à partir d'une matière végétale par entraînement à la vapeur d'eau, par distillation sèche, ou par des procédés mécaniques appliqués à l'épicarpe. Le produit extrait est ensuite séparé de la phase aqueuse par des méthodes physiques (AFNOR, 2000).

Contrairement aux huiles végétales, les huiles essentielles ne contiennent pas de corpsgras (Anton et Lobstein, 2005).

3.2.3. Localisation des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal, certaines familles botaniques, comme les Lamiacées, en sont particulièrement riches. Elles peuvent être présentes dans divers organes de la plante: les sommités fleuries (ex. : menthe), l'écorce (ex. : cannellier), les racines (ex. : vétiver), les rhizomes (ex. : gingembre) ou encore les fruits (ex. : anis, fenouil, badiane). Chez une même espèce, ces huiles peuvent se localiser dans plusieurs organes, avec une composition chimique qui peut varier selon l'organe. Les huiles essentielles peuvent être contenues dans des cellules sécrétrices isolées, comme chez les Lauracées, mais elles sont le plus souvent stockées dans des structures spécialisées : poches sécrétrices schizogènes (Rutacées), canaux sécréteurs (Conifères, Apiacées), ou poils sécréteurs (Lamiacées, Astéracées) (Brueton, 1999).

3.2.4. Le rôle des huiles essentielles dans les plantes

Chez les plantes, les huiles essentielles remplissent diverses fonctions essentielles dans les plantes. Elles sont produites en réponse à des facteurs environnementaux et agissent comme un moyen de défense. Par exemple, elles peuvent inhiber la germination en hiver, déclencher la floraison ou encore protéger la plante contre les parasites, les insectes ou les herbivores. De plus, elles jouent un rôle dans l'attraction des insectes pollinisateurs. Elles

interviennent aussi dans la régulation des conditions de pluviosité, contribuant ainsi à la résistance à la sécheresse (Vigan, 2010 ; Soualeh et Soulimani, 2016).

3.2.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Bien que leur composition chimique varie, les huiles essentielles partagent plusieurs caractéristiques physiques communes. Elles se présentent sous forme liquide à température ambiante et se distinguent des huiles dites « fixes » par leur volatilité. Généralement incolores, certaines peuvent toute fois présenter une légère coloration. Leur densité est en règle générale inférieure à celle de l'eau, à l'exception de quelques-unes comme les huiles essentielles de girofle ou de cannelle. Elles possèdent un indice de réfraction élevé et la majorité d'entre elles ont la capacité de dévier la lumière polarisée. Enfin, elles sont solubles dans les solvants organiques, mais ne le sont que très peu dans l'eau (Bruneton, 1999).

3.2.6. Les principaux méthodes d'extraction

3.2.6.1. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation (Figure5) est la méthode la plus fréquemment utilisée pour extraire les huiles essentielles (HEs). Le procédé consiste à plonger le matériel végétal dans un bain-marie, puis à chauffer l'ensemble jusqu'à ébullition, sous pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les composés aromatiques contenus dans les cellules végétales sont libérés sous forme d'un mélange azéotropique. Le mélange vapeur est ensuite condensé, permettant la séparation de l'eau et de l'huile essentielle par décantation (Hashemiet al., 2018).



Figure N° 5: Représentation schématique de l'hydrodistillation (Hashemi et al., 2018).

3.2.6.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau (figure 6) est l'une des méthodes officielles les plus couramment utilisées pour l'extraction des huiles essentielles. Contrairement à l'hydrodistillation, cette technique ne prévoit aucun contact direct entre l'eau et la matière végétale. La vapeur, produite par une chaudière, traverse la matière végétale placée au-dessus d'une grille. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les composés aromatiques, permet de limiter les risques d'hydrolyse ou de dégradation, préservant ainsi la qualité des huiles essentielles obtenues (El Haib, 2011).

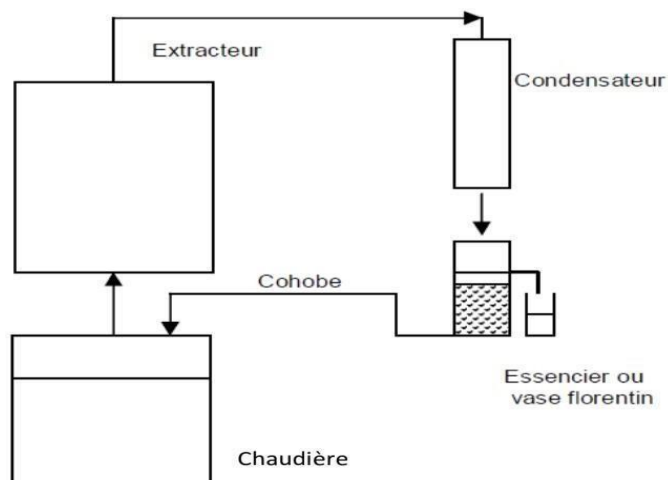
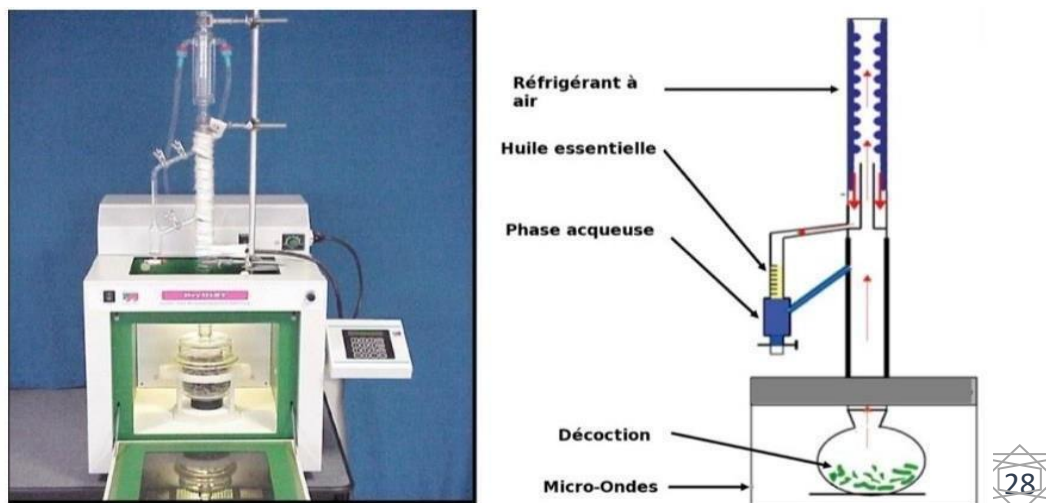


Figure N° 6: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Peyron et Richard, 1992).

3.2.6.3. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes

Cette technique a été appliquée à l'extraction de divers organes végétaux, comme les feuilles de *Pistacialentiscus*L. les épices de *Cuminumcyminum*L. et *Zanthoxylumbungeanum*L. ainsi que les fruits de thym (Bahramiet al., 2013). Son principal avantage (figure 7) réside dans la réduction significative du temps de distillation tout en améliorant le rendement en extrait.

Figure N° 7: L'appareillage du système de l'hydrodistillation sous micro-ondes (Chemat et al., 2012)



3.2.6.4. Hydrodiffusion

Est une technique dérivée de la distillation à la vapeur, à la différence que le flux de vapeur y est dirigé de haut en bas. Cette méthode repose sur l'effet osmotique de la vapeur d'eau et utilise la gravité pour extraire et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » à travers la matière végétale. Comme dans le cas de la distillation à la vapeur, cette technique présente l'avantage d'éviter le contact direct entre l'eau et le matériel végétal. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie notable grâce à une réduction du temps de distillation, ce qui entraîne une consommation moindre de vapeur (Lucchesi, 2005).

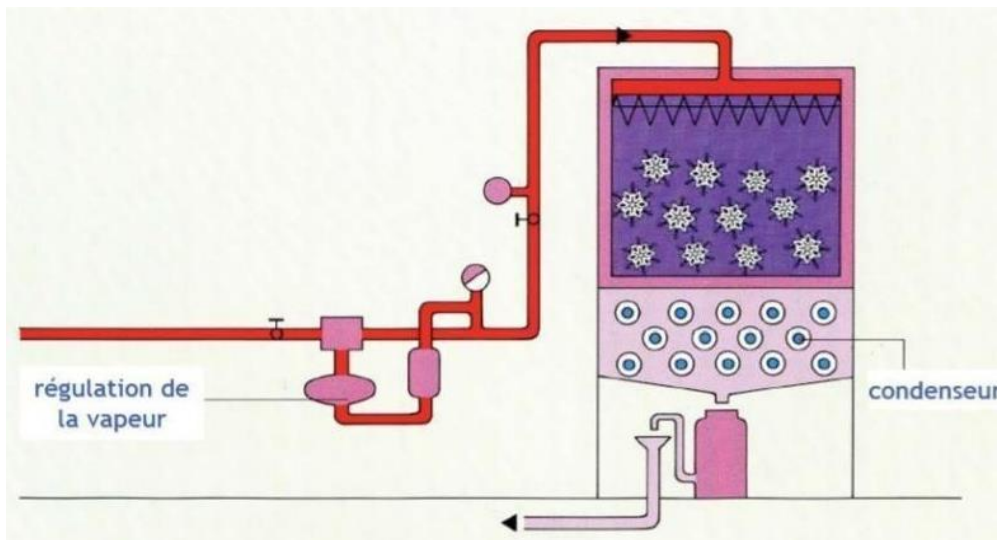


Figure N° 8: Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia, 2011).

3.2.6.5. L'expression à froid

L'expression à froid est une méthode couramment utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, notamment celles des agrumes. Elle repose sur un procédé mécanique visant à éclater les poches contenant l'essence. L'huile ainsi libérée est ensuite séparée soit par décantation, soit par centrifugation. Certaines machines utilisent une technique par dépression pour rompre les poches et récupérer directement l'huile essentielle, ce qui permet de limiter les altérations dues à la présence d'eau (Nzeyumwami, 2004).

3.3. Le genre *Mentha*

Les menthes, du nom latin *Mentha*, sont des plantes vivaces et herbacées, indigènes, appartenant à la famille des Lamiacées. Elles se distinguent facilement par leur parfum très caractéristique, mais il est souvent difficile de différencier les différentes espèces entre elles en raison de la présence de nombreuses formes intermédiaires issues d'hybridations. Parmi les Lamiacées, les menthes se reconnaissent non seulement par leur odeur particulière, mais aussi par leurs toutes petites fleurs (Bruneton, 1993).

3.3.1. *Mentha pulegium*

3.3.1.1. Définition

Mentha pulegium, communément appelée pennyroyal ou pennyrile, est une plante vivace, aromatique et herbacée appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Elle peut atteindre jusqu'à un demi-mètre de hauteur (Tutaret *al.*, 2016 ; Hadi *et al.*, 2017 ; Aitboulahsen *et al.*, 2018 ; Gülçinet *al.*, 2019). Originaires d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie mineure et du Proche-Orient (Mahboubi et Haghi, 2008 ; Pirmohammadi *et al.*, 2016). Cette espèce est l'une des vingt que compte le genre *Mentha*, réparties à travers le monde (Mahboubi et Haghi, 2008). Au Maroc et en Algérie, elle est connue sous son nom arabe « Fliou » (Zekriet *al.*, 2013 ; Brahmi *et al.*, 2016). Cette plante est traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreuses affections (Tutaret *al.*, 2016).

3.3.1.2. Description botanique

Il s'agit d'une plante mesurant entre 10 et 30 cm de hauteur, caractérisée par une inflorescence composée de nombreux verticilles denses, feuillus et bien espacés (Quézel et Santa, 1963). Elle dégage une odeur très marquée et possède une saveur fortement aromatique. Le nom *pulegium* provient du latin *pulex*, signifiant "puce", en référence à la capacité de la plante à repousser les insectes (Bekhechi, 2008). Les tiges, à section quadrangulaire, sont dressées ou légèrement étalées, de couleur verdâtre à grisâtre, et très ramifiées. Les feuilles, opposées, de petite taille, sont ovales à oblongues, entières, parfois légèrement dentées ou crénelées, et portées par un court pétiole. La floraison, qui s'étend de mai à fin septembre, donne des fleurs rose lilas, parfois blanches, disposées en glomérules bien espacés à l'aisselle des feuilles le long de la tige. Chaque inflorescence, de type cyme,

estportée à l'aisselle d'une bractée foliacée et peut contenir jusqu'à 30 fleurs(Quézel et Santa, 1963 ; Arvy et Gallouin, 2003).



Figure N° 9: Morphologie générale de la menthe pouliot (Bencheikh,2012;Gerenutti,2014).

3.3.1.3.Position systématique:

D'après Quézel et Santa(1963)et Guignard et Dupont (2004),lasystématique de *Menthapulegium* est la suivante :

Régne : Plantes

Embranchement :PhanérogamesouSpermaphytes

Sous-embranchement:Angiospermes

Classe : Eudicots

Ordre : Lamiales

Famille: Lamiacées

Genre:*Mentha*

Espèce:*Mentha pulegium* L.

3.3.1.4.Usages traditionnels

Dansl'Antiquité,les Grecs aromatisaient fréquemment leur vin avec du pennyroyal. Bien que cette plante ait également été largement utilisée en cuisine au Moyen Âge, son usage culinaire a peu décliné et elle est aujourd'hui rarement employée à cet effet. Les feuilles de *Mentha pulegium* servaient notamment à parfumer les puddings (Zekriet *al.*,2013 ; Hadi *etal.*,2017). En médecine traditionnelle, cette plante était consommée sous forme d'infusion,

de tisane ou de poudre pour traiter divers maux tels que la bronchite, la coqueluche, le rhume, les maux de gorge ou encore les troubles digestifs (Aitboulahsenet *al.*,2018 ; Gülçinet *al.*,2019). Les parties aériennes fleuries de *M. pulegium* étaient particulièrement prisées pour leurs propriétés antimicrobiennes dans le traitement de maladies dégénératives comme le diabète, le cancer, l'artériosclérose, l'hypercholestérolémie, ainsi que de diverses infections telles que la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, la bronchite et la tuberculose. Elle était également utilisée comme antifatulent, carminatif, expectorant, diurétique et antitussif (Mahboubi et Hagi, 2008 ; Gülçinet *al.*,2019).

3.4. Composition phytochimique de *Mentha pulegium*L.

3.4.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques forment une large classe de métabolites secondaires végétaux, définis par la présence d'au moins un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Chez *Mentha pulegium*, ils jouent un rôle essentiel dans la défense contre les stress environnementaux et les pathogènes, tout en contribuant aux propriétés pharmacologiques de la plante (Bouyahyaet *al.*, 2019).

3.4.1.1. Les flavonoïdes

Parmi les composés phénoliques, les flavonoïdes constituent un sous-groupe majeur présent dans *Mentha pulegium* (Politeoet *al.*, 2018). On y retrouve notamment:

3.4.1.2. La lutéoline: et ses dérivés, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Seelingeret *al.*, 2008).

3.4.1.3. L'apigénine : ainsi que des composés apparentés comme la scutellarine et le tiliroside, qui participent aux effets biologiques de la plante (Zielińska et Matkowski, 2014).

3.4.1.4. Les acides phénoliques: Ce groupe comprend:

- A. **L'acide rosmarinique:** un ester d'acide phénolique particulièrement actif tant qu'antioxydant et anti-inflammatoire, fréquemment observé dans les espèces de menthe.
- B. **L'acidecaféique:** l'acide chlorogénique et l'acide gallique, qui apportent des contributions notables à l'activité biologique globale de la plante (Hossainet *al.*, 2010).

3.4.2. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols complexes à haut poids moléculaire, capables de se lier aux protéines et aux ions métalliques. Ils sont présents en proportions significatives dans *Mentha pulegium*, où ils jouent un rôle dans ses propriétés médicinales, notamment les effets astringents et antimicrobiens. On distingue deux grandes catégories (**Tanavaret al., 2021**):

- ✓ **Les tanins hydrolysables** : tels que l'acide gallique et ses dérivés (**Sharma et al., 2019**).
- ✓ **Les tanins condensés**: ou proanthocyanidines, aux structures plus polymérisées.

3.4.3. Les terpènes

Les terpènes sont les constituants majeurs des huiles essentielles, largement présents chez *Mentha pulegium*. Ils se caractérisent par des structures formées d'unités isoprènes (**Bouyahya et al., 2019**).

3.4.4. les huiles essentielles de *Mentha pulegium* L.

La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. a été largement étudiée dans la littérature. L'huile essentielle de cette plante est particulièrement riche en monoterpènes et sesquiterpènes, parmi lesquels:

Le pulégone : Principal composant de l'huile essentielle, responsable de l'odeur typique de la menthe pouliot. Toutefois, son emploi requiert prudence en raison de sa toxicité à fortes doses (**Agnhatriet al., 2005**).

La menthone et l'isomenthone : Cétones monoterpéniques contribuant à la fragrance et aux effets biologiques de l'huile.

Lelimonène: Un monoterpène cyclique aux notes citronnées.

Le β -pinène et l' α -pinène: Terpènes bicycliques présents en quantités moindres (**Wojtuiket al., 2019**).

Autres composés: L'huile essentielle peut également contenir des traces de caryophyllène et d'oxyde de caryophyllène, entre autres, en quantités plus faibles (**Macchioniet al., 2003**).

En effet, plusieurs études ont rapporté une dominance marquée de certains composés selon les régions d'origine : la pulégone est majoritaire avec des taux allant de 70 à 90 % en Algérie (**Beghidjaet al., 2007 ; Lahrech, 2010**), 80,3 % au Maroc (**Bouchra et al., 2003**), 65,9 à 83,1 % en Inde (**Agnihotriet al., 2005**), 73,4 % en Uruguay (**Lorenzo et al., 2002**) et 43,5% en Égypte (**El-Ghorab, 2006**). D'autres études révèlent une dominance de la pipériténone, notamment en Grèce avec des taux variant de 83,7 à 97,2 % (**Kokkiniet al., 2002**), ou encore de la pipéritone, observée à 70,0 % en Autriche (**Zwaving et Smith, 1971**).

La composition de l'huile essentielle peut varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que la localisation géographique, l'ensoleillement, ou encore la nature du sol (**Silvant, 2015**).

3.5. Activités biologique des huiles essentielles de *Mentha pulegium*L.

Les huiles essentielles de *M.pulegium* tirent leurs principales activités biologiques du pulégone, un composé majeur aux propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, insecticides et inhibitrices des cholinestéras. Malgré ses effets bénéfiques, le pulégone peut être toxique pour le foie à fortes doses, ce qui nécessite une utilisation prudente (**El-Ghorab, 2006**).

3.5.1. Activité antibactérienne

Les HEs issues de *Mentha pulegium* suscitent un intérêt scientifique croissant en raison de leurs propriétés antibactériennes contre divers types de bactéries. Cette activité est largement attribuée à la présence de composés bioactifs tels que le pulégone, la menthone et le 1,8-cinéole. Leur mode d'action repose sur une perturbation de la perméabilité membranaire. Ces substances lipophiles s'insèrent dans la bicouche phospholipidique, affectant la stabilité des structures membranaires et entraînant des fuites cytoplasmiques et qui menant à la lyse cellulaire (**Trombetta et al., 2005 ; Bakkali et al., 2008**). Il a également été observé que ces huiles sont généralement plus actives contre les bactéries Gram positif, dont la paroi cellulaire est moins complexe, contrairement aux bactéries Gram négatif, protégées par une membrane externe supplémentaire (**Nazzaro et al., 2013**).

3.5.2. Activité antifongique

Dans les secteurs phytosanitaires et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent être utilisés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes ainsi que contre les micro-organismes contaminant les denrées alimentaires (**Lis-Balchin, 2003**).

L'huile essentielle de *Mentha pulegium* (Menthe pouliot) manifeste une activité antifongique significative, attribuée principalement à ses composés majeurs tels que la pulégone, le menthone et l'isopulegol. Ces molécules agissent en inhibant efficacement la croissance et la sporulation de divers champignons, y compris des pathogènes agricoles comme *Botrytis cinerea* et *Monilinia fructicola*, ainsi que des moisissures courantes telles que *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.. Cette efficacité fait de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* une alternative naturelle prometteuse aux fongicides synthétiques, bien que son utilisation doive être maniée avec une extrême prudence en raison de la toxicité potentielle de la pulégone pour le foie (Ghazghaziet al., 2013).

3.5.3. Activité antioxydante

Parmi les plantes aromatiques riches en principes actifs, *Mentha pulegium* se distingue par son huile essentielle dotée d'une activité antioxydante remarquable. Cette propriété est essentiellement liée à sa richesse en composés monoterpéniques, notamment la pulégone, le menthone, l'isomenthone et parfois la carvone, selon le chémotype. Ces molécules possèdent des groupements fonctionnels capables de neutraliser les radicaux libres, réduisant ainsi les dommages oxydatifs au niveau cellulaire. La pulégone, en particulier, joue un rôle ambivalent: elle agit comme antioxydant à faibles concentrations mais peut devenir toxique à doses élevées (Sarikurkcu et al., 2012).

3.6. Toxicité

L'huile essentielle de *Mentha pulegium*, est connue pour sa toxicité élevée, principalement due à sa forte concentration en pulégone. Ce composé cétone est hépatotoxique et neurotoxique à des doses même relativement faibles. L'ingestion de cette huile, même en petites quantités, peut entraîner des dommages hépatiques graves, potentiellement irréversibles, allant de la nécrose hépatique à l'insuffisance hépatique aiguë. Des symptômes tels que des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, des vertiges, des convulsions, et dans les cas les plus sévères, le coma et la mort, ont été rapportés. En raison de sa toxicité, l'utilisation de l'huile essentielle de Menthe pouliot est fortement déconseillée par voie interne, et son application cutanée doit être réalisée (Odeyemiet al., (2009).

Chapitre 4

Matériel et méthodes

4. Matériel et Méthodes

4.1. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de deux échantillons de l'huile essentielle extraite de *Mentha pulegium* de deux périodes différentes (récolté en juillet 2024 et avril 2025) contre *Staphylococcus aureus* et l'effet sur la formation de biofilm.

4.2. La bactérie testée

Dans Cette étude une souche de référence a été utilisée afin de renforcer la crédibilité des expériences réalisées. Il s'agit de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, une souche couramment adoptée dans les recherches microbiologiques.

4.2.1. Purification

A fin de purifier la bactérie testée *Staphylococcus aureus* ATCC25923, des repiquages successif sur milieu Chapman et sur milieu Baird Parker (BP) ont été réalisées et incubés pendant 24 à une température de 37 °C.

Staphylococcus aureus donne des colonies jaunes crémeuses bombées de 1 à 2 mm de diamètre dégradant le mannitol en acide lactique sur Chapman (abaissement du pH = acidification du milieu).

La gélose BP représente le milieu de choix en bactériologie alimentaire car il permet la meilleure purification des souches de *S. aureus* grâce à ses constituants de base (lithium) et au jaune d'œuf rajoutés.

4.2.2. Identification

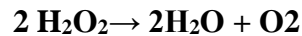
4.2.2.1. Examen microscopique

Cette étude a été réalisée à l'aide d'une coloration de Gram, une technique permettant selon le type de paroi bactérienne de classer les bactéries en deux groupes : Gram positifs ou Gram négatifs. Les bactéries apparaissent en violet sont qualifiées de Gram positifs, tandis que celles prenant une teinte rose sont considérées comme Gram négatifs. Elle permet également d'observer la morphologie des bactéries, qu'elles soient en forme de bâtonnets (bacilles) ou sphériques (cocci)...etc. Permet ainsi de déterminer le mode de groupement de la bactérie testée.

4.2.2.2. Recherche de la catalase

Principe

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques bactériennes conduisent à la formation d'eau oxygénée.. La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'O₂ sous forme gazeuse(Holt *et al.*, 1994)selon la réaction suivante. :



Technique

Apartir d'une culture jeune sur milieu solide dans des conditions aérobie, prélever une colonie et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

Lecture

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'air.

4.2.2.3. Recherche de la coagulase

Principe

Les Staphylocoques à coagulase positive (SCP) y compris *Staphylococcus aureus* présente la propriété de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant. C'est un critère important de son identification. La coagulation est due a la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase.

La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium

Fibrinogène soluble + Coagulase (staphylocoagulase) + Prothrombine → Fibrine (insoluble) + Peptides → Polymérisation en caillot

Etapas de réalisation de la technique

- Réaliser une culture de la bactérie testée en bouillon BHIB et incuber pendant 24h à 37°C.
- Après l'incubation, mettre dans un tube à hémolyse 1ml de cette culture avec 1ml de plasma de Lapin.

Incuber les tubes à 37°C pendant 24h, puis observer les tubes chaque 2 heures jusqu'à 8 heures et la dernière observation réaliser après 24h. (Cheng *et al.*, 2010)

4.2.2.4. Système d'identification biochimique API Staph

C'est un système standardisé pour l'identification des bactéries comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

Les galeries API Staph comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (Win *et al.*, 2006).

Technique

1. Préparation de l'inoculum

- Réaliser une pré-culture sur gélose nutritive de 20h à 37°C
- Préparer une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0,5 McFarland.

2. Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une micropipette remplir les microtubes de la galerie avec la suspension préparée : (remplir que les tubes et non les cupules), sans dépasser le niveau du tube tout en évitant la formation de bulles d'air au fond des tubes.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine
- Renfermer la boîte et incuber à 35°C pendant 24h.

4.3. Antibiogramme

Principe

L'antibiogramme est l'étude de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques et repose sur l'évaluation de la capacité d'une souche bactérienne à se développer en présence de différents antibiotiques. Il permet de déterminer si la bactérie est sensible, intermédiaire ou résistante à chaque antibiotique testée.

Technique

1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 20h, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologie. La suspension bactérienne obtenue doit être homogénéisée et ajustée à une opacité d'environ de 0,5 Mc Farland. Il faut procéder l'ensemencement dans les 15 min qui suivent la préparation de la suspension. (**Bhakti et al., 2024**)

2. Ensemencement et application des disques d'antibiotique

Le milieu Müller-Hinton a été coulé dans des boîtes de Pétri de manière à obtenir une épaisseur uniforme d'environ 4 mm, conformément aux recommandations standards afin d'assurer une diffusion homogène des antibiotiques.

L'ensemencement se fait en frottant un écouvillon, trempé préalablement dans la suspension bactérienne, sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas et en stries serrées.

L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. A la fin l'ensemencement, l'écouvillon est passé sur la périphérie de la gélose.

- Déposer les disques d'antibiotiques (au maximum 6 antibiotiques par boîte).
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile.
- Incuber les boîtes 24 h à 37°C. (**Ammari et al., 2011 ; Jehl et al., 2015**)

3. Lecture

La lecture de l'antibiogramme se fait comme suit :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition
- Comparer ces résultats aux valeurs dans la table de lecture suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). (**Tepe et al., 2004**)
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

4.4. Matériel végétal

Deux échantillons de la partie aérienne de la plante *Menthapulegium* ont été récoltés dans la région de Khemis Miliana (Wilaya d'Ain Defla). Le premier échantillon a été récolté en mois de juillet 2024 et le deuxième échantillon en mois d'avril 2025. Le matériel végétal est séché à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré. Après le séchage, les échantillons sont récupérés dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle.



Figure N° 10 : *Menthapulegium* 2024 (Juillet).



Figure N° 11 : *Menthapulegium* 2025 (Avril).

4.4.1. Détermination de taux de l'humidité

Le taux d'humidité, ou teneur en eau, est défini comme la perte de masse enregistrée après le séchage d'un échantillon, traduisant ainsi la quantité d'eau initialement présente dans la matière (Audigié *et al.*, 1978), et déterminé par la formule classique décrite par Twidwell *et al.* (2002) et Simpson (1999).

$$H\% = (\text{Poids } \alpha - \text{Poids } \beta) / \text{Poids } \alpha \times 100$$

H% : Taux d'humidité exprimé en %.

α : Poids de l'échantillon « plante sèche » en g.

⚡: Poids de l'échantillon « Plante sèche » en g.



Figure N° 12: Feuille de *Mentha pulegium* (Fliou) avant et après séchage (photo originale).

4.4.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a été réalisée à partir de la plante séchée en utilisant la technique d'entraînement à la vapeur d'eau, comme illustré dans la figure. Le dispositif employé comprend une cuve inférieure contenant de l'eau chauffée, une chambre supérieure renfermant la matière végétale, un conduit pour la vapeur, un condenseur et un récipient de collecte. Lorsque l'eau entre en ébullition, la vapeur générée traverse la plante placée dans le panier. Cette vapeur entraîne alors les composés volatils contenus dans la matière végétale. Le mélange vapeur-huile essentielle est ensuite dirigé vers un condenseur en serpentin, où il est refroidi pour se liquéfier. Le distillat obtenu est recueilli dans un séparateur, permettant la séparation de l'huile essentielle de l'hydrolat grâce à leur différence de densité. Cette méthode, à la fois douce et efficace, est particulièrement bien adaptée à l'extraction des huiles essentielles des plantes aromatiques comme la menthe pouliot, car elle permet de préserver les qualités des composés volatils extraits. (El Haib, 2011)



Figure N° 13: L'appareillage d'extraction des HEs de *Menthapulegium* par entraînement à la vapeur d'eau.

4.4.3. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle (Rd) est défini comme le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite (M') et la masse de la matière végétale initialement utilisée (M). Le rendement d'extraction des huiles essentielles a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$Rd (\%) = M' / M . 100$$

Rd: rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).

M': masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).

M: masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g)

4.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des HES de *Mentha pulegium*L.

4.5.1. Méthode de diffusion en disque (aromatogrammes)

La méthode de diffusion en disque, également appelée méthode de Vincent ou aromatogramme, a été développée initialement par Schroeder et Messing en 1949. Elle s'apparente à un antibiogramme, à la différence près que les disques d'antibiotiques y sont remplacés par des disques imprégnés par des huiles essentielles ou des extraits aromatiques (**Bachiriet al., 2016**). Dans cette approche, des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés par les deux échantillons des huiles essentielles. Ces disques sont ensuite déposés sur la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton préalablement ensemencé par la bactérie testée (*Staphylococcus aureus*) la suspension ensemencée doit être standardisée à une turbidité équivalente au standard de 0,5 McFarland. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C. Après l'incubation l'activité antibactérienne est évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (**Das et al., 2010**).

4.5. 2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible à l'œil nu d'un microorganisme après une incubation de 18 à 24 heures (**Andrews, 2001**).

La technique de micro-dilution en milieu liquide est la méthode choisie pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui constitue une méthode plus simple et plus économique. Actuellement, elle est reconnue comme méthode de référence internationale pour l'évaluation de la sensibilité antimicrobienne (**Schwalbe et al., 2007**).

Une série de dilutions croissantes de l'huile a été préparée dans des tubes, puis transférée dans une microplaque à 96 puits. Une suspension bactérienne standardisée a été ajoutée à chaque puits. Un témoin positif (bactéries sans huile) et un témoin négatif (milieu sans bactéries) ont été inclus. La microplaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, les puits ont été observés visuellement. La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'huile pour laquelle aucune croissance bactérienne visible n'est observée.

4.5.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration d'un agent antibactérien capable d'éliminer plus de 99,9% de l'inoculum bactérien initial, c'est-à-dire ne laissant survivre que moins de 0,1 % des bactéries. La détermination de la CMB se fait après la lecture de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Elle consiste à évaluer la viabilité bactérienne en présence de concentrations des HES égale ou supérieures à la CMI. Pour cela, des prélèvements sont réalisés à partir des puits qui ne présentant aucune turbidité visible (indiquant l'absence de croissance bactérienne) et étalés en stries sur un milieu gélosé, puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. La concentration la plus faible à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée sur le milieu solide est considérée comme la CMB (Woolfrey et Lally, 1986 ; Biyitiet *al.*, 2004).

4.6. Effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L sur la formation de biofilm

L'effet des concentrations subinhibitrices de deux échantillons des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L sur la formation de biofilm chez *Staphylococcus aureus* a été évaluée en utilisant la Méthode d'analyse de cristal violet dans une microplaque à 96 puits. Les étapes de préparation des concentration des huiles essentielles et de leurs distributions dans le microplaque sont les mêmes étapes réalisés dans la détermination de la CMI. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24 heures afin de permettre l'adhésion et la formation du biofilm sur les parois des puits. Après l'incubation, le contenu des puits a été délicatement éliminé, puis les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau distillé pour éliminer les bactéries non adhérentes. Ensuite, 200 µL de violet de cristal à 0,1 % ont été ajoutés dans chaque puits et laissés en contact pendant 20 minutes à température ambiante. Après coloration, l'excès de colorant a été éliminé, suivi d'un trois rinçage des puits. L'intensité de la coloration reflétant la biomasse du biofilm qui a été évaluée visuellement ou en solubilisant le colorant fixé avec 200µl d'éthanol, puis en mesurant l'absorbance à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Niu *et al.*, 2004).

Chapitre 5

Résultats et discussion

5. Résultats et Discussion

5.1 Le taux d'humidité

La figure 14 qui représente la répartition du taux d'humidité et la matière sèche de *Menthapulegium* L. récoltée en avril 2025 a révélé un taux d'humidité élevé, estimé à environ 85 %, tandis que la matière sèche ne représente que 15 %. Cette matière sèche a servi comme base pour l'extraction des huiles essentielles.

Ce taux élevé d'humidité observé au printemps peut s'expliquer par les conditions climatiques caractéristiques de cette période, telles qu'une température modérée et une humidité ambiante importante. Ces facteurs contribuent à une teneur élevée en eau, réduisant ainsi la proportion de matière sèche disponible pour l'extraction.

Des travaux antérieurs vont dans le même sens, notamment ceux de Hazzit *et al.* (2020), qui ont constaté que les plantes récoltées au printemps présentaient une humidité plus importante par rapport à celles récoltées en été, ce qui impacte négativement le rendement en huiles essentielles en raison de la faible quantité de biomasse sèche exploitable.

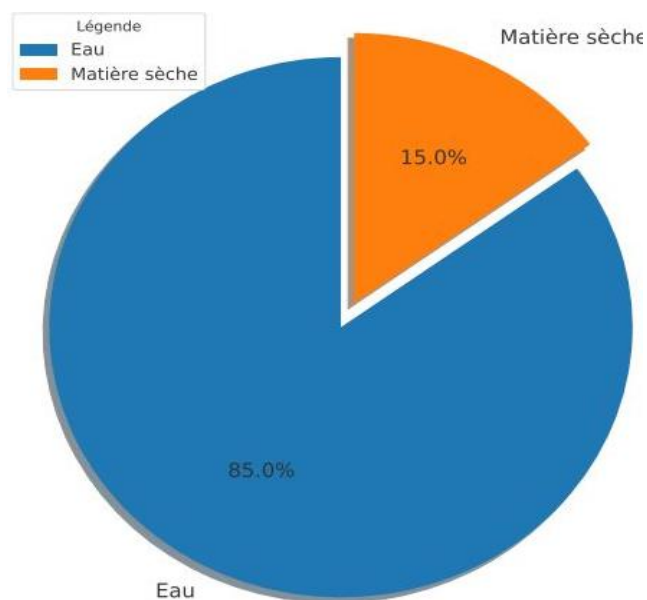


Figure N° 14: Le taux d'humidité de la plante *Menthapulegium* L. récoltée en 2025.

5.2 Rendement d'extraction des huiles essentielles chez *Menthapulegium*

Les résultats obtenus de l'extraction des huiles essentielles de la plante *Menthapulegium* ont révélé une variabilité notable du rendement entre les deux périodes de récolte étudiées. En effet, le rendement en huile essentielle a atteint **0,63 %** pour l'échantillon récolté en Juillet 2024, tandis qu'il a chuté de manière significative à **0,24 %** pour celui récolté en Avril 2025 (Tableau 2)

Tableau N° 2: Rendement d'extraction en huiles essentielles de *Mentha pulegium*L.

Période de récolte	Rendement en (%)
Juillet 2024	0,63
Avril 2025	0,24

Cette différence marquée reflète clairement l'influence de la période de récolte sur le rendement d'extraction des huiles essentielle pour cette plante. Des facteurs environnementaux et physiologiques, eux-mêmes exerce un effet sur la productivité de la plante. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans des travaux ultérieurs. Une étude menée par Smith *et al.* (2020) souligne que la productivité en huiles essentielles chez les plantes aromatiques est fortement influencée par divers paramètres, notamment le stade phénologique de la plante, les conditions climatiques (telles que la température, l'humidité et l'intensité lumineuse), ainsi que le moment de la récolte dans la journée. Par ailleurs, Johnson et Williams (2018) ont rapporté que les rendements les plus élevés (entre **0,5 % et 0,8 %**) sont généralement obtenus durant la phase de floraison, une période qui pourrait correspond à celle de juillet 2024, ce qui expliquerait le rendement relativement élevé enregistré à ce moment-là.

La baisse significative du rendement observée en avril 2025 pourrait être attribuée au fait que la plante se trouvait alors dans une phase végétative précoce, caractérisée par de faibles concentrations en composés secondaires responsables de la biosynthèse des huiles essentielles. De plus, les conditions climatiques propres au mois d'avril (comme des températures plus basses ou une humidité plus élevée ne favorisent pas l'accumulation efficace des huiles volatiles, contrairement aux conditions estivales plus favorables du mois de juillet.

Dans ce contexte, le rendement élevé observé en juillet 2024 peut être attribué à une accumulation plus importante du pulegone durant la phase de floraison, période au cours de laquelle les conditions climatiques chaudes et sèches favorisent l'activation des voies métaboliques responsables de la biosynthèse des huiles volatiles (Zheljazkovet *al.*, 2013). En revanche, la baisse enregistrée en avril 2025 coïncide avec un stade végétatif précoce, caractérisé par des niveaux réduits de métabolites secondaires, notamment le pulegone et la menthone, en raison d'une différenciation biochimique limitée et de l'absence de conditions environnementales optimales (telles qu'un ensoleillement intense et des températures élevées) nécessaires à l'accumulation efficace des huiles essentielles (Mimica-Dukićet *al.*, 2003).

5.3. Revivification et purification de la bactérie testée

5.3.1. Sur le bouillon nutritif

Dans le Bouillon Nutritive (BN), la croissance de la bactérie testée apparaît sous forme de trouble dans le milieu et concentrée au fond du tube (Figure 15).



Figure N° 15: Aspect de la souche testée dans un Bouillon Nutritif (photo personnelle)

5.3.2. Sur la gélose nutritive (GN)

Sur la gélose nutritive, les colonies de *Staphylococcus aureus* sont lisses de coloration jaune pale (Figure 16).

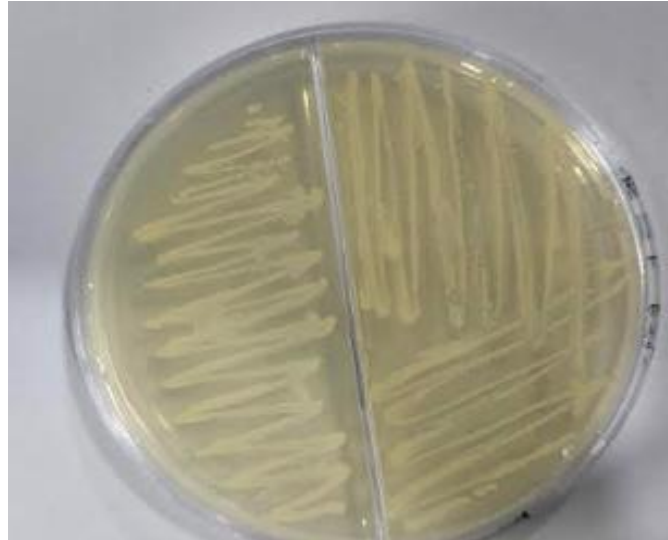


Figure N° 16: Aspect des colonies de *S. aureus* sur la gélose nutritive (photo personnelle)

5.3.3. Sur le milieu Chapman

Les colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman sont bombées de 1 à 2mm de diamètre, entourées d'une auréole jaune cela indique la fermentation du mannitol (Figure 17).

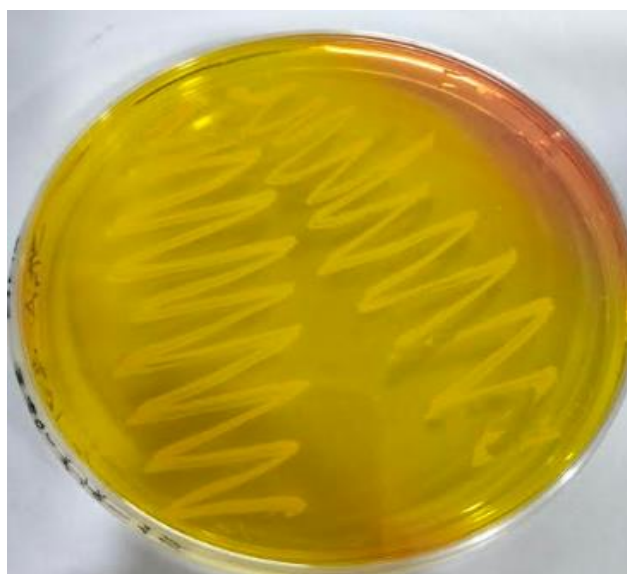


Figure N° 17: Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman (photo personnelle).

5.3.4. Sur milieu Baird-Parker

Caractéristiques les plus distinctives de la croissance de *Staphylococcus aureus* sur le milieu de Baird-Parker est la présence des colonies blanches avec un centre noire entourées d'un halo transparent (Figure18).

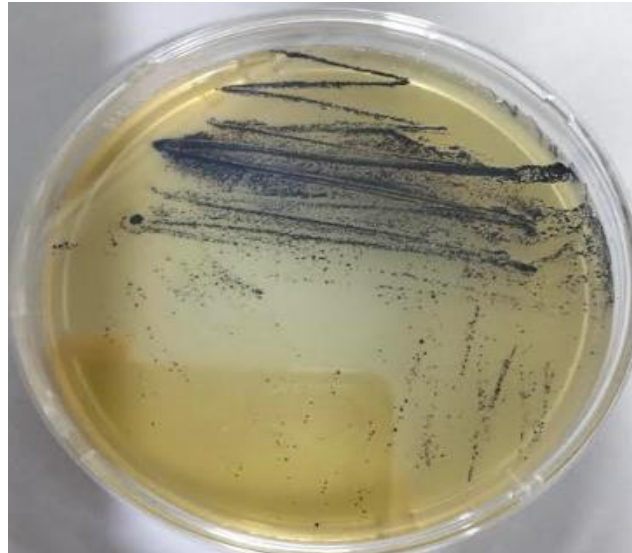


Figure N° 18: Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Baird-Parker (photo personnelle).

5.4 Observation microscopique (Coloration de Gram).

Les résultats de la coloration de Gram ont montré que la bactérie testée se présente sous forme de cocci de couleur violet groupé en amas sous forme des grappes de raisin (Figure 19), ce qui indique qu'elle s'agit d'une bactérie à coloration de Gram positive.

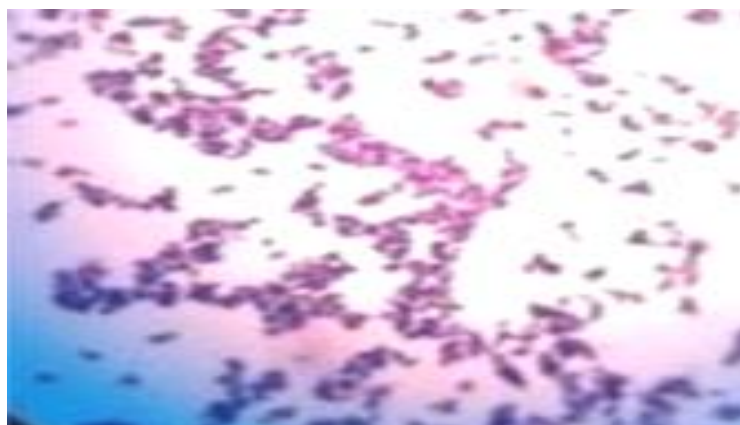


Figure N° 19: Observation microscopique de la bactérie testée après une coloration de Gram.

5.5. Test de la catalase

Résultat positif au test de catalase, comme en témoigne par l'apparition immédiate de bulles d'air suite à l'application du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur la colonie (Figure 20). Ce résultat confirme la présence de l'enzyme catalase, caractéristique des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, telles que les espèces du genre *Staphylococcus*. Cette propriété permet de distinguer facilement le genre *Staphylococcus* (catalase positif) du genre *Streptococcus* (catalase négatif), et constitue une étape fondamentale dans l'identification présomptive des cocci à Gram positif.



Figure N° 20: Résultat de test catalase.

5.6. Test de coagulase

Le test de la coagulase réalisé pour la souche testée a donné un résultat positif. En effet, une formation nette d'un caillot au fond du tube a été observée après incubation, traduisant la présence de l'enzyme coagulase. Ce résultat confirme fortement que la souche testée appartient à l'espèce *Staphylococcus aureus*, connue pour sa capacité à produire cette enzyme caractéristique.

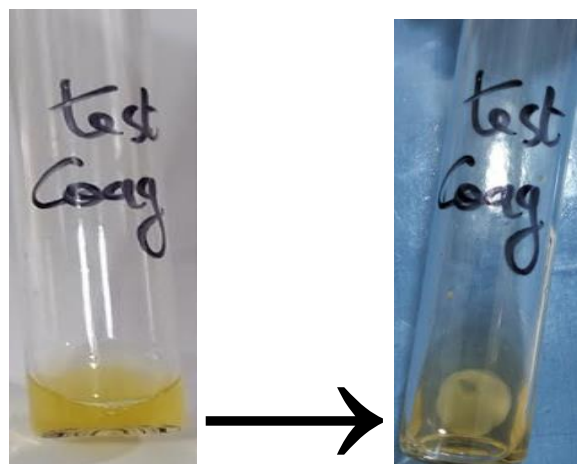


Figure N° 21: Résultat de test de la coagulase (Photo personnelle)

5.7. Résultat d'identification par galerie Api Staph

Après une incubation de 24h à 37 °C de la galerie API Staph inoculée avec la souche bactérienne testée (Figure 22), la lecture des résultats se fait à l'aide d'un catalogue fourni par le fabricant, qui constitue une base de données contenant l'ensemble des profils microbiens. L'interprétation repose sur l'observation des réactions biochimiques (positives ou négatives), se manifestant par des changements de couleur (voir Figure). L'analyse combinée de ces réactions permet d'établir un code numérique spécifique. Le code obtenu permet d'identifier que la bactérie testée est une souche de *Staphylococcus aureus*.



Figure N° 22: Identification biochimique de *Staphylococcus aureus* à l'aide d'un API Staph.

5.8. Etude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques (Antibiogramme)

Les résultats de l'antibiogramme indiquent que la souche testée de *Staphylococcus aureus* présente une forte résistance à la majorité des antibiotiques testés (Figure 23), notamment à la pénicilline (P), l'érythromycine (ERX), le chloramphénicol (C), la pipéracilline/tazobactam (PT) et la kanamycine (CMN). Ce profil traduit un phénomène de multi-résistance préoccupant, déjà largement rapporté dans la littérature scientifique (Kaur et Chate, 2015 ; WHO, 2023). Cependant, l'isolat s'est montré sensible à certains antibiotiques tels que la céfoxitine (FOX), le sulfaméthoxazole/triméthoprim (SXT), l'oxacilline (OXA), l'amikacine (AK), la gentamicine (CN), la ciprofloxacine (CIP), et l'acide fusidique (FAD).

La sensibilité à la céfoxitine et à l'oxacilline suggère que la souche n'est probablement pas un MRSA (*Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline), ce qui constitue un point positif dans la prise en charge clinique (Patel *et al.*, 2020).

La résistance élevée à la pénicilline est cohérente avec les données de l'OMS, qui indiquent que plus de 90 % des souches de *S. aureus* produisent une β -lactamase, un enzyme

responsable de l'inactivation des antibiotique de groupe β -lactamines. De plus, la résistance à l'érythromycine est souvent liée à des modifications ribosomiques ou à l'expression de pompes d'efflux.

Bien que certaines options thérapeutiques restent efficaces, la fréquence des résistances souligne l'importance d'adapter les traitements selon les profils de sensibilité locaux.

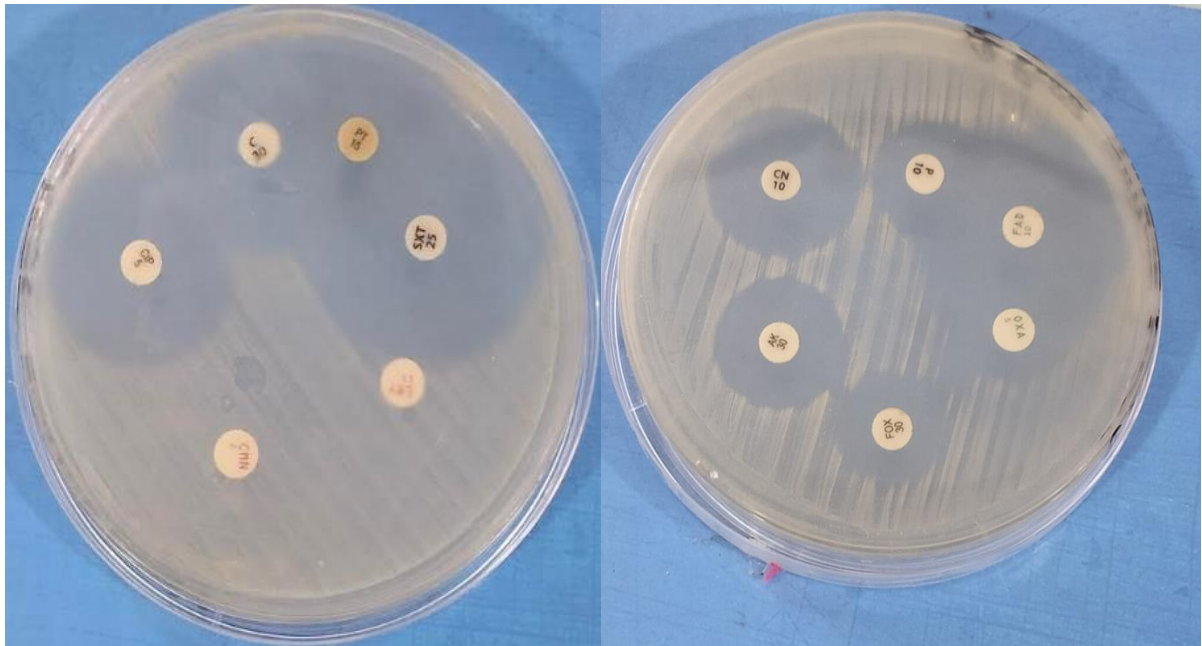


Figure N° 23: Résultats d'antibiogramme *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques testés (Photo personnelle)

Tableau N° 3: Résultats de l'antibiogramme de la souche testé de *Staphylococcus aureus* suivant les valeurs de référence fournies par CA-SFM 2024.

Nom d'antibiotique	Abréviation	Diamètres critiques (mm)			Ø (mm)	Interprétation
		R	I	S		
Gentamycine	CN	≤ 20		>20	34	S
Amikacine	AK	≤ 14	15-16	≥17	30	S
Pénicilline G	P	≤ 28		≥ 29	20	R
L'acide fusidique	FAD	≤21		≥ 22	30	S
Oxacilline	OXA	≤10	11-12	≥ 13	20	S
Céfoxitine	FOX	< 20	23-24	>25	27	S
Ciprofloxacine	CIP	< 20		>20	40	S
Kanamycine	CMN	≤ 20		>20	0	R
Chloramphénicol	C	≤ 18	19	≥ 20	15	R
Pipéracilline/Tazobactam	PT	≤ 20	20-21	≥ 22	15	R
Sulfaméthoxazole/ Triméthoprime	SXT	≤ 14	15-16	≥ 17	40	S
Erythromycine	ERX	≤ 13	14	≥ 15	0	R

5.9. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Menthapulegium*

5.9.1. Résultats d'aromatogramme

Dans cette étude, l'effet antibactérien de deux échantillons d'huile essentielle de *Menthapulegium* ont été testé contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 l'un issu de la plante récolté en mois de Juillet **2024**, l'autre récolté en mois d'Avril **2025**.

Les résultats d'activité antibactérienne réalisés par la méthode de l'aromatogramme ont révélé des zones d'inhibition de **23 mm** pour l'huile essentielle de *Menthapulegium*

récoltée en Juillet 2024 et de **24 mm** pour l'échantillon récolté en Avril 2025 (Figure 24). Ces résultats témoignent d'une activité antibactérienne pour les deux échantillons des huiles essentielles de la plante testée (*Menthapulegium*) notable contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

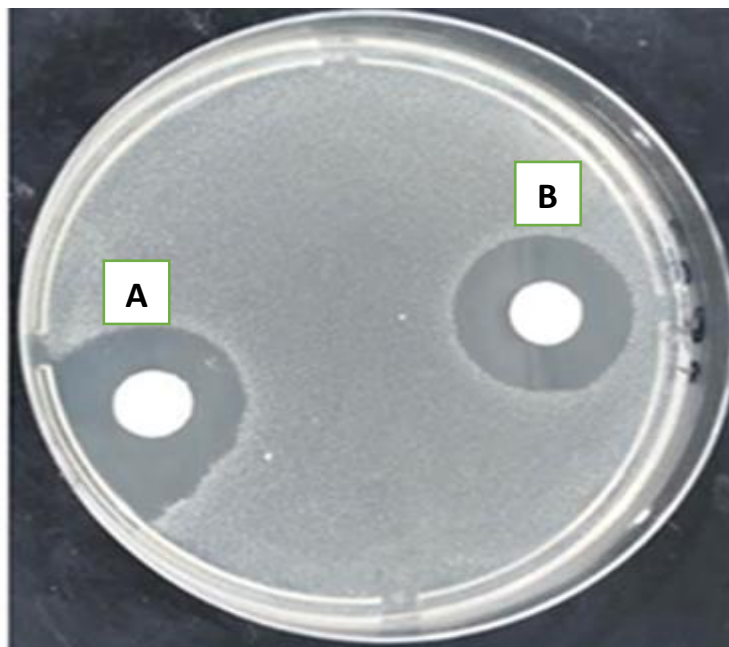


Figure N° 24: Résultat d'aromatogramme des HEs de *Menthapulegium* contre *S. aureus*. (A) l'huile essentielle de *Menthapulegium* récolté en Avril 2025 et (B) pour l'échantillon récoltée en Juillet 2024. (Photo personnelle).

Ces observations confirment l'efficacité significative de notre huile, en particulier celle de 2025 qui présente une légère efficacité (+1 mm) de l'activité antibactérienne par rapport à l'échantillon de 2024. Lorsque ces données sont comparées à celles rapportées dans la littérature, elles se situent dans la fourchette des diamètres observés. Par exemple, **Mahboubi et Hagi (2008)** ont rapporté des diamètres allant de 8 à 21 mm contre des bactéries Gram positives, Selon Bouyahya *et al.* (2017), les zones d'inhibition observées pour l'huile essentielle de *Menthapulegium* contre *Staphylococcus aureus* variaient entre 20 et 25 mm. De même, Khadiret *et al.* (2020) ont rapporté des diamètres allant de 22 à 26 mm, en fonction de la période de récolte et de l'origine géographique des plantes. Par ailleurs, Mahmoudi *et al.* (2019) ont obtenu une zone d'inhibition de 21 mm, qu'ils ont attribuée à une teneur élevée en pulegone et isomenthone. En revanche, Oukilet *et al.* (2021) ont noté une activité mais avec un diamètre de 19 mm, À l'inverse, Ben Hsouna *et al.* (2022) ont enregistré une zone d'inhibition plus importante atteignant 25 mm, justifiée par une composition riche en carvone et 1,8-

cinéole. Dans une étude menée par Tutaret *al.* (2021), des diamètres dépassant les **22 mm** ont été observés contre *Acinetobacter baumannii*, une bactérie multirésistante.

Ainsi, les résultats obtenus dans notre étude (23–24 mm) se situent dans la fourchette de l'activité antibactérienne rapportée dans la littérature, ce qui suggère une bonne qualité de l'huile essentielle extraite et confirme son potentiel en tant qu'agent antibactérien naturel efficace contre *Staphylococcus aureus*.

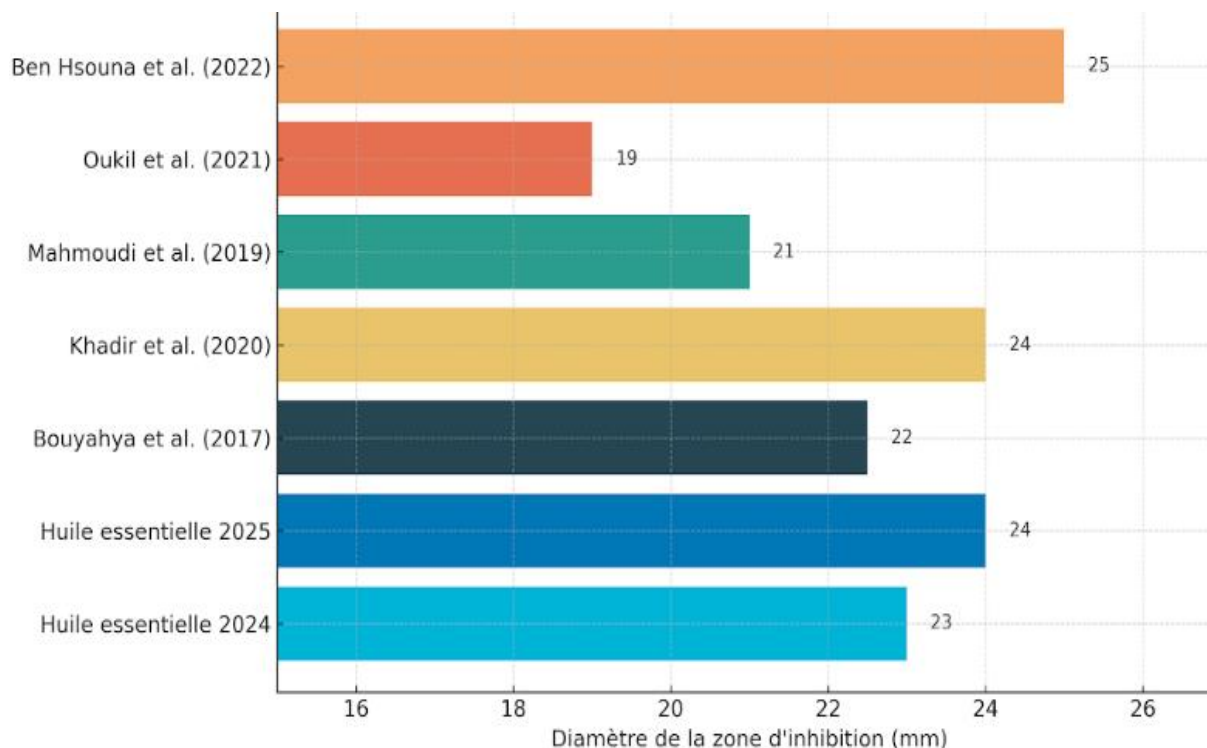


Figure N° 25: Comparaison des diamètres d'inhibition (en mm) de nos résultats avec d'autres études réalisés sur les huiles essentielles de *Menthapulegium* contre *S. aureus*

5.10. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La technique de microdilution en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI de deux échantillons des huiles essentielles de *Menthapulegium* contre *S. aureus*

Les résultats ont montré que huiles essentielle de l'échantillon récolté en mois de juillet **2024** avait une **CMI** de **0,31 mg/mL** et une **CMB** de **1,25 mg/mL**, tandis que celle de l'échantillon récolté en mois d'avril **2025** présentait une **CMI** égale à la **CMB** (**0,31 mg/mL**) (Figures 26, 27 et 27).

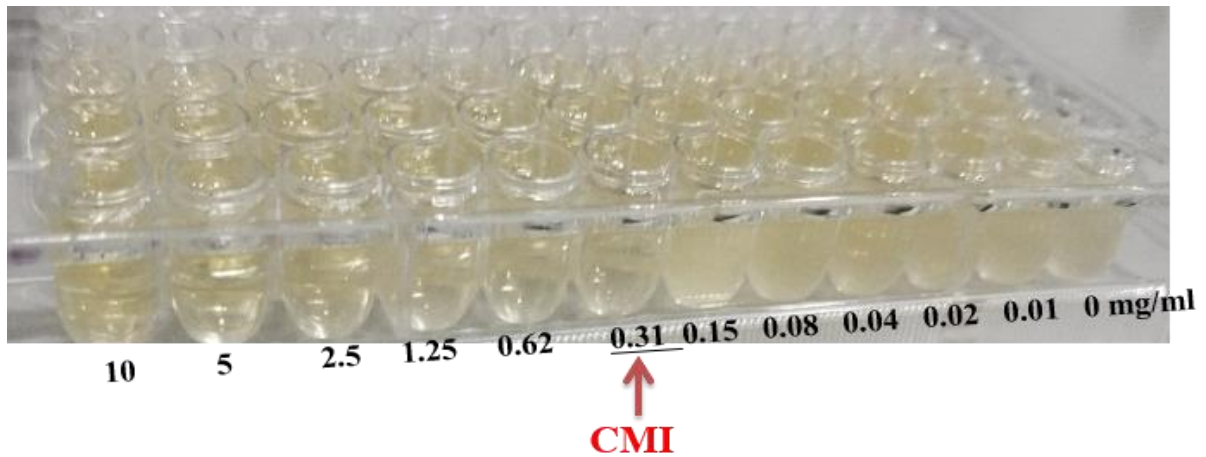


Figure N° 26: CMI de Menthapulegium a S. aureus (Photo personnelle)

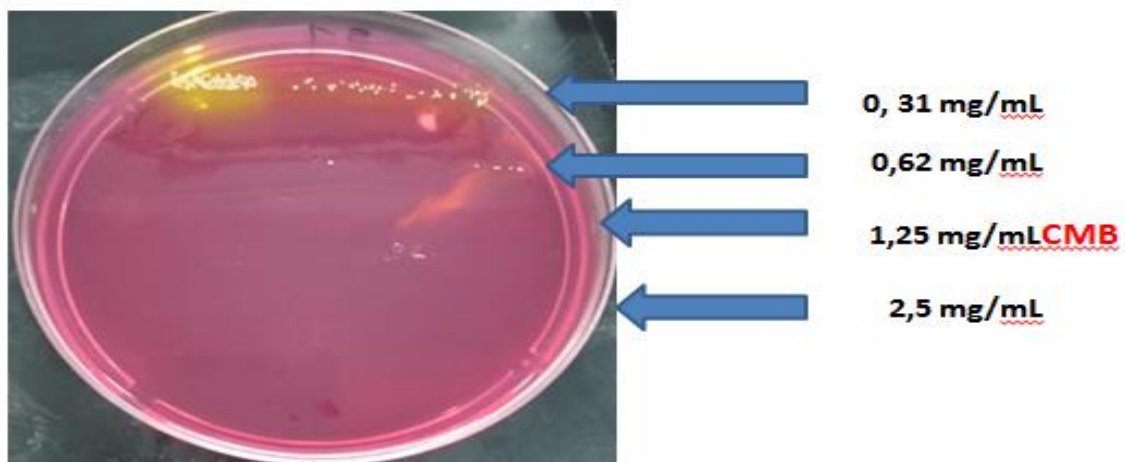


Figure N° 27: CMB de l'huile essentielle de Menthapulegium récolté en Avril 2024 (Photo personnelle).

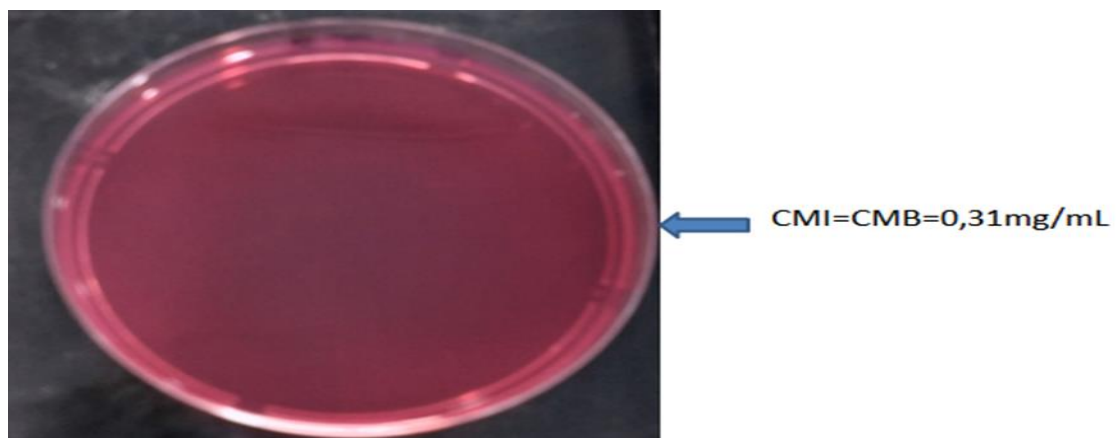


Figure N° 28: CMB de l'huile essentielle de *Menthapulegium* récolté en juillet 2025 (Photo personnelle).

Ces données indiquent que l'huile essentielle de l'échantillon récolté en mois d'avril 2025 est plus puissante avec un effet bactéricide, puisqu'elle élimine la bactérie dès le seuil

inhibiteur atteint (CMI = CMB). En revanche, l'huile de l'échantillon récolté en mois de Juillet 2024 agit contre la bactérie testée de manière bactériostatique.

Dans l'étude de Soković *et al.* (2009), l'huile essentielle de *Menthapulegium* a présenté une CMI de 0,32 mg/mL contre *Staphylococcus aureus*, une valeur très proche de celle obtenue dans notre échantillon de 2025 (0,31 mg/mL), soutenant ainsi l'efficacité bactéricide à faible concentration. En revanche, Güvenç *et al.* (2005) ont rapporté des CMI comprises entre 2 et 4 mg/mL contre différentes souches bactériennes, indiquant une efficacité plus faible.

L'étude de Ben Jemâa *et al.* (2012) en Tunisie a révélé une CMI de 0,78 mg/mL contre *Escherichia coli* et de 1,25 mg/mL contre *Staphylococcus aureus*. Dorman et Deans (2000) ont montré que les huiles essentielles des espèces de *Mentha* présentaient des CMI allant de 0,25 à 0,50 mg/mL, en soulignant que la présence de composés phénoliques et aldéhydiques joue un rôle clé dans l'efficacité antimicrobienne contre les bactéries Gram⁺ et Gram⁻.

Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Dont les conditions post-récolte et, notamment les conditions de séchage. En effet, l'échantillon d'avril 2025 a été séché dans un environnement bien ventilé, à l'abri de la lumière, ce qui constitue des conditions idéales pour préserver les composés volatils sensibles tels que le pulégone (Pulegone) et la menthone. Alors que l'échantillon de juillet 2025 a été acheté sous forme sèche donc on ne connaît pas vraiment si elle est séchée dans les conditions convenables pour le séchage des plantes aromatiques. Selon Turek et Stintzing (2013), une exposition à la chaleur ou à la lumière durant le séchage peut entraîner l'oxydation ou la dégradation thermique des molécules actives, réduisant ainsi l'efficacité antimicrobienne des huiles. Boutekedjir *et al.* (2003) ont également montré que le séchage en plein soleil peut significativement altérer la qualité des huiles essentielles, en particulier celles riches en monoterpènes.

En plus, les conditions climatiques pendant la croissance de la plante jouent un rôle crucial dans la biosynthèse des métabolites secondaires. Des facteurs tels que la température, l'humidité et l'ensoleillement influencent la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles. Mimica-Dukić *et al.* (2010) ont démontré que le contenu en pulégone de *Menthapulegium* varie considérablement selon la saison et la localisation géographique.

5.11. L'effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus*

Suivant les résultats obtenus par l'étude de l'effet de deux échantillons d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur la formation de biofilm chez *Staphylococcus aureus*, une différence nette dans l'intensité de la coloration violette entre les puits a été observée après la coloration par cristal violet. Une diminution progressive de l'intensité de la coloration a été enregistrée avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles testées, indiquant une activité inhibitrice dose-dépendante, ce qui reflète l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus*. Ce résultat est attribué à la capacité de l'huile essentielle à interférer avec les étapes de formation du biofilm, notamment l'adhésion initiale des cellules bactériennes, ce qui est lié à la présence de composés chimiques actifs tels que le pulegone et la menthone, connus pour leurs propriétés antibactériennes et anti-biofilm (Bouyahya *et al.*, 2017).

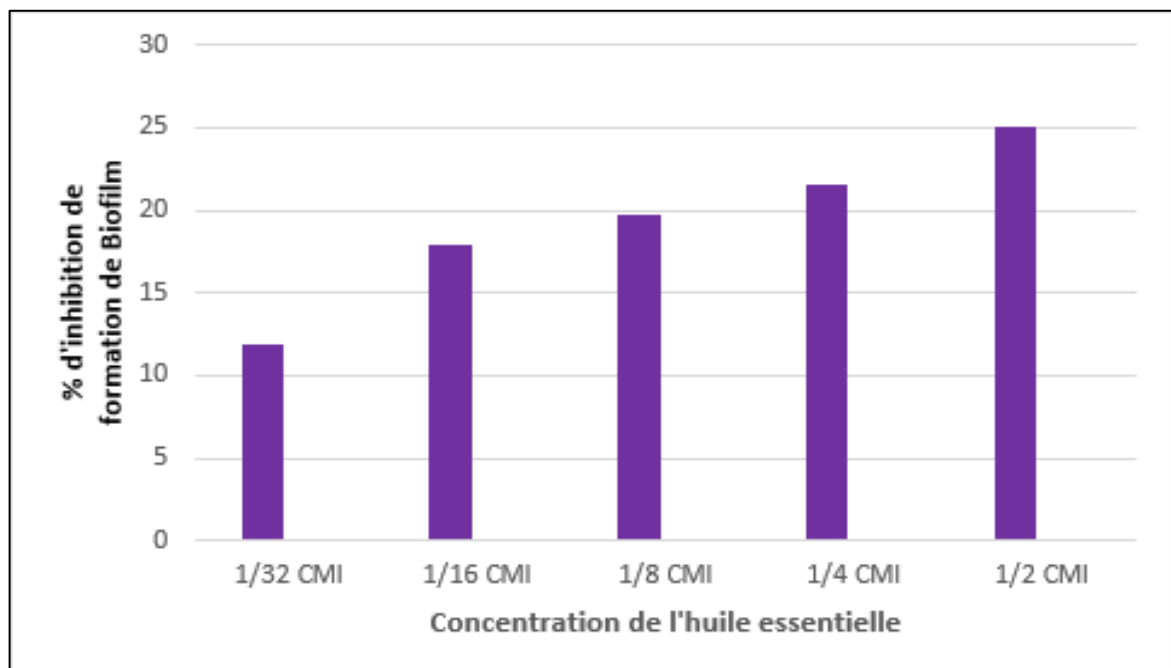


Figure N° 29: Effet de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* récolté en juillet 2024 sur la formation de biofilm de *staphylococcus aureus*

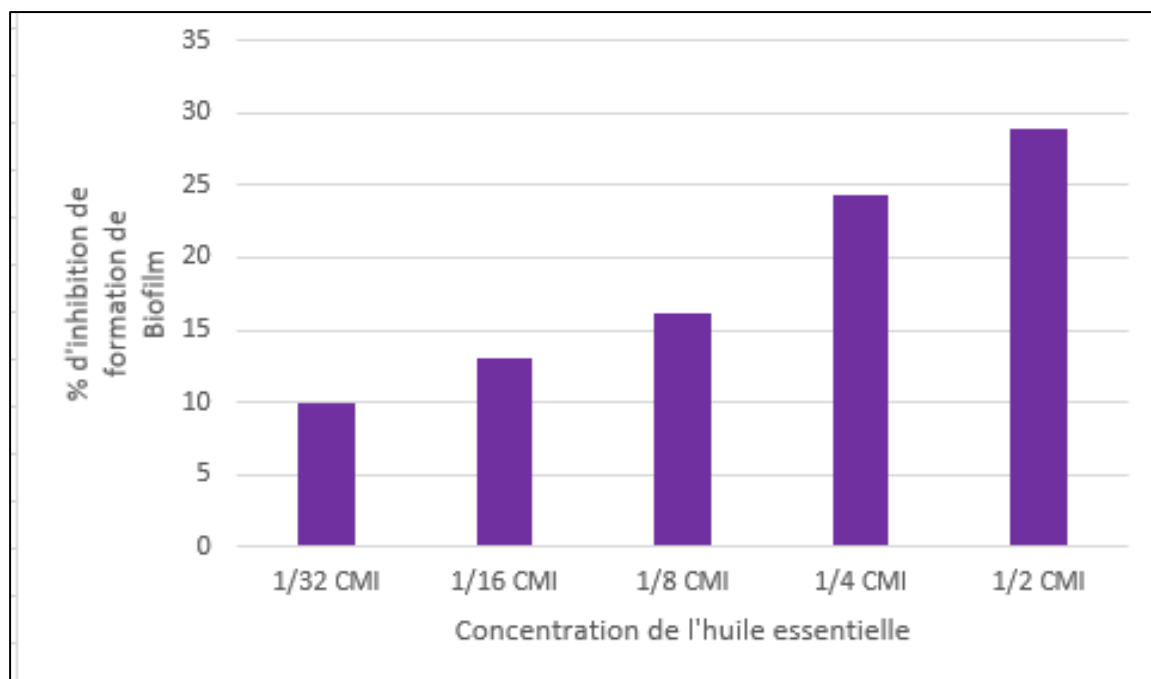


Figure N° 30: Effet de l'huile essentielle de *Menthapulegium* récolté en avril 2025 sur la formation de biofilm de *staphylococcus aureus*

Les Figure 29 et 30 montrent que le pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm chez *S. aureus* augmente progressivement avec l'augmentation la concentration des huiles essentielles de *Menthapulegium* testés. En effet, le pourcentage d'inhibition (%I) de la formation de biofilm a été mesuré pour les cinq concentrations subinhibitrices décroissantes de l'huile essentielle (de 1/2 CMI à 1/32 CMI). La concentration la plus élevée (1/2 CMI) a présenté un pourcentage d'inhibition moyen de 28,87 pour l'huile essentielle de l'échantillon récolté en Avril 2025 et de 25,07 pour l'échantillon récolté en juillet 2024, indiquant une activité inhibitrice marquée à cette dose. À l'opposé, la plus faible concentration (1/32 CMI) a généré une inhibition nettement plus faible pour les deux huiles essentielles testées. Ces données traduisent une relation dose-dépendante entre la concentration de l'huile essentielle testé et son effet inhibiteur sur la formation de biofilm. L'huile essentielle de *Menthapulegium* possède une capacité évidente à inhiber la formation du biofilm chez *Staphylococcus aureus*, notamment à des concentrations proches de la 1/2 CMI, ce qui est en accord avec les données récentes de la littérature scientifique. En effet, l'étude de Bouyahya *et al.* (2017) a montré que les huiles essentielles extraites de *Menthapulegium* et de *Rosmarinus officinalis* présentent une activité antibactérienne significative, en particulier contre les souches résistantes, grâce à la présence de composés actifs tels que le pulegone et la menthone, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et anti-biofilm. De plus, Bendjama *et al.* (2016) ont mis en évidence l'effet

direct de l'huile essentielle de *Menthapulegium* sur des souches multi-résistantes d'*Acinetobacter baumannii*, en enregistrant une activité anti-biofilm avoisinant les 30 % à une concentration équivalente à la $\frac{1}{2}$ CMI. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle cette huile agit sur différentes étapes de la formation du biofilm, aussi bien chez les bactéries à Gram positif que Gram négatif.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

L'essor inquiétant des résistances bactériennes aux antibiotiques et aux systèmes immunitaires, en particulier chez les bactéries nosocomiales dont *Staphylococcus aureus*, fait de la recherche des alternatives naturelles aux antibiotiques une priorité majeure en santé publique. Dans ce contexte, cette étude s'intéresse à évaluer l'effet des huiles essentielles extraites de *Menthapulegium* (Menthe pouliot) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et sa capacité à former un biofilm, un mode de vie bactérien particulièrement résistant aux traitements conventionnels.

L'extraction des huiles essentielles par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau montre que le rendement d'extraction est de 0,63 % pour l'échantillon récolté en Juillet 2024, tandis qu'il est seulement de 0,24 % pour celui récolté en Avril 2025.

Les résultats obtenus ont révélé que les huiles essentielles testées de *Menthapulegium* exercent une activité antibactérienne notable vis-à-vis de *S. aureus*, avec des zones d'inhibition de 23mm pour l'huile essentielle de la plante récoltée en Juillet 2024 et de 24mm pour l'échantillon récolté en Avril 2025. En plus, La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a montré que l'huile essentielle de l'échantillon récolté en juillet 2024 avait une CMI de 0,31 mg/mL et une CMB de 1,25 mg/mL, tandis que celui de l'échantillon récolté en Avril 2025 présentait une CMI égale à la CMB (0,31 mg/mL) et qui montre que cette huile exerce un effet bactéricide contre *S. aureus*. Suivant de ces résultats, on conclue que le moment de récolte de la plante *Menthapulegium* exerce un effet sur la qualité des huiles essentielles extraites.

On a conclue aussi que la quantité de biofilm formée par la bactérie testée (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) a été diminuée par l'augmentation de concentration des huiles essentielles de *Menthapulegium*.

Ces résultats soutiennent l'intérêt croissant pour ces huiles essentielles comme agents thérapeutiques naturels à potentiel antibactérien et anti-biofilm. Toutefois, des études complémentaires restent nécessaires pour approfondir la compréhension des mécanismes d'action moléculaires, en vue d'une application future dans le domaine médical ou agroalimentaire.

Donc en perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées :

- Tester autres activités biologiques de ces huiles essentielles.

Conclusion

- Etudier la composition phyto-chimiques des huiles par GC-MS pour permet d'identifier les molécules actives responsables de ses activités biologiques.
- Confirmer par des tests «*in vivo*» est nécessaire pour confirmer l'intérêt thérapeutique.

Les références

Les références

A

Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*.

AFNOR. (2000). *Norme NF T 75-006*. Association Française de Normalisation.

Agnihotri, S., Wakode, S., & Ali, M. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Menthapulegium* from India. *Journal of Essential Oil Research*.

Ahmed, K., Zaidi, S. S. A., & Ali, M. (2019). Regulatory mechanisms in biofilm formation. *Journal of Applied Microbiology*.

Aitboulahsen, A., El Fadeli, S., & El Hamdaoui, L. (2018). Composition chimique et activités biologiques de *Menthapulegium*. *Revue Marocaine de Recherche Scientifique*.

Ananthanarayan, R., & Paniker, C. K. J. (2006). *Textbook of Microbiology*. Orient Longman.

Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier.

Audigié, D., et al. (1978). Détermination du taux d'humidité des échantillons végétaux. *Techniques d'analyse alimentaire*.

B

Baggett, H. C., Hennessy, T. W., Leman, R., Hamlin, C., & Bruden, D. (2004). Protein A production in *Staphylococcus aureus*. *Infectious Disease Reports*.

Bahrami, G., Bahrami, S., & Bahrami, H. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils. *International Journal of Green Pharmacy*.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*.

Batiard, R., et al. (2007). Rôle des protéines de liaison à la fibronectine dans les infections ostéo-articulaires. *Infectious Diseases Journal*.

Becker, K. (2018). Capsule and virulence in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*.

Les références

- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Berthier, A. (1980). *Histoire de la distillation en Méditerranée*. Éditions du CNRS.
- Biyiti, L., et al. (2004). Antibacterial activity of essential oils from Cameroonian medicinal plants. *Fitoterapia*, 75(3), 288–292.
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLOS Pathogens*.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., et al. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities of *Menthapulegium* L. *Medicinal Chemistry*.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: Plantes médicinales, phytochimie*. Éditions Lavoisier.
- Bhakti, A., et al. (2024). Total Plate Number Test at 0.5 McFarland Standard in *Escherichia coli* Culture. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 25(2).

C

- Clarke, S. R., & Foster, S. J. (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in Microbial Physiology*.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*.
- Courvalin, P., Carlier, C., & Lambert, T. (1990). Agents antibactériens. *Médecine Sciences*.
- Cheng, A. G., McAdow, M., Kim, H. K., Bae, T., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2010). Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001036

D

- Dufour, D., Levesque, C. M., & al. (2002). The agr system in *S. aureus*. *Journal of Bacteriology*.
- Dworkin, M., et al. (2006). *The Prokaryotes*. Springer.

Les références

E

El-Ghorab, A. H. (2006). Chemical composition and biological activity of Egyptian *Menthapulegium* oil. *Flavour and Fragrance Journal*.

F

Fauchere, J. L., & Avril, J. L. (2002). *Microbiologie médicale*. Éditions Ellipses.

Foster, T. J. (2013). Surface proteins of *S. aureus*. *Molecular Microbiology*.

G

Gülçin, İ., Gören, A. C., & al. (2019). Biological activities of *Menthapulegium*. *Journal of Ethnopharmacology*.

H

Hadi, A., et al. (2017). Étude ethnobotanique et phytochimique de *Menthapulegium*. *African Journal of Traditional Medicine*.

Hashemi, M., et al. (2018). Extraction of essential oils using hydrodistillation. *Iranian Journal of Chemistry*.

Hiramatsu, K. (2001). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

K

Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*.

Kluytmans, J., Van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *S. aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*.

L

Lahrech, A. (2010). Étude de l'huile essentielle de *Menthapulegium* en Algérie. *Phytothérapie*.

Le Loir, Y., & Gantier, J. C. (2010). Typage des souches staphylococciques. *Annales de Biologie Clinique*.

Lis-Balchin, M. (2003). *Aromatherapy Science*. Pharmaceutical Press.

Les références

Lorenzo, D., Dellacassa, E., & Moyna, P. (2002). Chemical composition of *Menthapulegium* oil from Uruguay. *Journal of Essential Oil Research*.

M

Mahboubi, M., & Hagi, G. (2008). Antimicrobial activity of *Menthapulegium*. *Asian Journal of Chemistry*.

Mimica-Dukić, N., et al. (2003). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Mentha* species. *Journal of Ethnopharmacology*.

Möller, H. (2008). *Histoire de la distillation. Revue d'histoire des sciences pharmaceutiques*.

N

Nazzaro, F., Fratianni, F., & al. (2013). Essential oils in food preservation. *Molecules*.

Niu, C., et al. (2004). Quantification of biofilm formation using crystal violet staining and microplate absorbance. *BioTechniques*, 36(5), 840–846.

P

Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*.

Pirmohammadi, R., et al. (2016). Botanique de *Menthapulegium*. *Plant Science Today*.

Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2018). Chemical composition of *Menthapulegium* oil. *Food Chemistry*.

Peyron L., Richard Hubert. (1992). L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. *Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris*

S

Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2013). Bioactivity of aromatic plants. *Phytotherapy Research*.

Sarikurku, C., Tepe, B., & al. (2012). Antioxidant activities of *Menthapulegium*. *Natural Product Research*.

Silvant, L. (2015). Facteurs influençant la composition des huiles essentielles. *Aromathérapie & Plantes médicinales*.

Simpson, W. T. (1999). Drying and moisture determination of herb samples. *USDA Forest Products Laboratory*.

Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance in biofilms. *Lancet*.

T

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction and application. *Journal of Food Science*.

Les références

Tutar, A., et al. (2016). Utilisation thérapeutique de *Menthapulegium*. *Journal of HerbalMedicine*.

Twidwell, L. G., et al. (2002). Moisture content determination in dried plant materials. *Journal of Agricultural Research*.

Touaitia, R. (2016). Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline: Emergence et mécanismes de résistance. Université Badji Mokhtar–Annaba

W

Win, S. H., et al. (2006). API identification system for staphylococci: Method and database utility. *Journal of ClinicalMicrobiology*.

Winn, W. C., Allen, S. D., & et al. (2002). *Koneman'sColor Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott.

Woolfrey, B. F., & Lally, R. T. (1986). Minimum bactericidal concentration (MBC) testing in antimicrobialevaluation. *Diagnostic Microbiology and InfectiousDisease*.

Z

Zekri, S., et al. (2013). Étude ethnobotanique de la menthe pouliot. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques*.

Zwaving, J. H., & Smith, D. C. (1978). Composition of *Menthapulegium*oilfromAustria. *Journal of Essential OilResearch*.

Annexes

Annexe 1 Annexe 1 : Informations sur la souche bactérienne utilisée

Souche testée : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- Origine : collection de souches de référence (ATCC).
- Justification du choix : standard international reconnu en microbiologie.
- Caractéristiques principales :
 - Morphologie : cocci, en amas (grappe de raisin)
 - Coloration de Gram : positive (violet)
 - Catalase : positive (bulles immédiates)
 - Coagulase : positive (formation de caillot)
 - API Staph : code numérique confirmé → *Staphylococcus aureus*

Annexe 2 : Milieux de culture et caractéristiques

- GN : colonies jaunes pâles, lisses
- Chapman : colonies bombées, fermentation du mannitol → halo jaune
- Baird-Parker : colonies noires avec halo clair → indication *S. aureus*

Annexe 3 : Coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60°C (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

Annexe 4

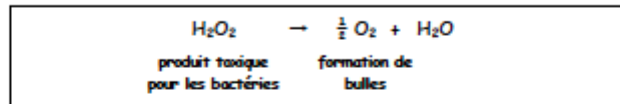
LA CATALASE

1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

2. Principe

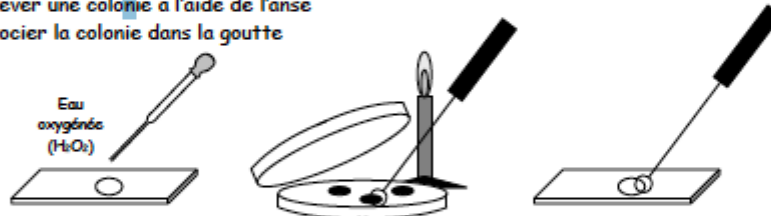
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center; vertical-align: middle;">  </div>	Catalase - <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center; vertical-align: middle;">  </div>

Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu contenant la catalase
Exemple : réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- o quantité de bactéries insuffisante
- o eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

Annexe 5



API STAPH SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ET MICROCOQUES

d'après bioMérieux sa

API STAPH est un système d'identification des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* comportant des tests biochimiques standardisés et miniaturisés et une base de données spécifique. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
			NEGATIF	POSITIF
0	Aucun	Témoin négatif	rouge	—
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Mélibiose	(Témoin positif) Acidification à partir du carbohydrate	rouge	jaune
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
			incolore-rose pâle	rouge
PAL	β -naphtyl ac. phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
			jaune	violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbinol	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			incolore	violet-rose
RAF XYL SAC MDG NAG	Raffinose Xylose Saccharose α -méthyl-D-glucoside N-acétyl-glucosamine	Acidification à partir du carbohydrate	rouge	jaune
<u>ADH</u>	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	Urée	Uréase	jaune	rouge-violet