

Université Mustapha Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي
معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques
Laboratoire de Géo Environnement et Développement des Espaces

THESE de DOCTORAT

Spécialité: **Biotechnologie et communication Microbiennes**

Intitulé:

Valorisation des propriétés anti-bactériennes de certaines phyto-molécules bioactives comme alternative thérapeutique contre les bactéries pathogènes antibiorésistantes.

Présentée par : Mlle. Tabti Soumia

Le 16/02/2026

Devant le jury:

Président	Sahnouni Fatma	Prof	Université de Mascara
Examineur	Benfreha Hamida	MCA	Université de Mascara
Examineur	Djellouli Mustapha	MCA	Université de Relizane
Examineur	Medjdoub Houria	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	Belgharbi Asmaa	MCA	Université de Mascara
Encadreur	Boukraa Djamila	MCA	Université de Mascara

Année Universitaire : 2025-2026

Remerciement

Je rends grâce à Dieu, qui m'a accordé le privilège de poursuivre mes études et de rencontrer des personnes d'une grande valeur, qu'il s'agisse de mes professeurs, collègues ou proches. Leur soutien, leurs connaissances et leur bienveillance ont été des sources inestimables d'inspiration et de formation tout au long de mon parcours.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, pour le temps qu'ils y ont consacré et pour leurs remarques constructives.

- *Pr. Sahnouni Fatma, Présidente, Université de Mascara,*
- *Pr. Djellouli Mustapha, Examineur, Université Ahmed Zabana de Relizane,*
- *Dr. Medjdoub Houria, Examinatrice, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen,*
- *Dr. Benfreha Hamida, Examinatrice, Université de Mascara,*
- *Dr. Belgharbi Asma, Examinatrice, Université de Mascara,*

*J'exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance à ma directrice de thèse, Dr **Boukraâ Djamila**, pour son encadrement bienveillant, son soutien constant, ses précieux conseils et sa grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, sa patience et ses encouragements ont été pour moi une source d'inspiration et ont grandement contribué à la réussite de ce travail.*

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur **Harizia**, directeur du Laboratoire de Géo-Environnement et Développement des Espaces de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, pour son accueil, sa disponibilité et son soutien tout au long de mes recherches.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement M. **BOUFADDEN ALI** technicien au Laboratoire de l'hôpital yesaad khaled, pour m'avoir accordé l'accès au laboratoire et pour son aide et son soutien.*

*Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à monsieur de doyen Pr. **Hemimed** de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, pour son soutien et ses précieux conseils.*

*Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à Pr. **Righi Kada**, enseignant-chercheur à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, pour son soutien et ses précieux conseils.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à **Dr Benouaz Nadia**. Pour son précieux soutien et ses conseils éclairés tout au long de mon parcours, je lui exprime ma plus vive gratitude.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **M. Bousdra** pour sa contribution inestimable à ce travail, son aide précieuse et son soutien constant.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous mes amis, **Belaouni Meriem, Semmache Naouel, Kreiri Senia, Douad youssra et Benmasoud Amel**, pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements constants, leurs conseils avisés et leur présence amicale tout au long de ce parcours, qui m'ont grandement aidé à mener à bien cette étude.*

Dédicace

À la gentille âme de mon père qui nous a quittés trop tôt. Puissent son souvenir et son exemple éclairer toujours mon chemin.

*Toi qui n'es plus là, mais dont la présence continue d'éclairer mes pas.
Ton souvenir vit dans chacun de mes efforts, dans chaque réussite, dans chaque rêve que je poursuis.*

Tes paroles, ton courage et ton amour demeurent ma plus belle leçon de vie.

*Ce travail, je te le dédie, avec tout mon cœur, comme un modeste reflet de ce que tu m'as appris :
la persévérance, la dignité et la foi en soi.*

*Puisse ce modeste aboutissement être le témoignage de ton héritage dans ma vie,
et que, de là où tu es, tu sois fier de ta fille.*



À ma chère mère,

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour ton amour, ton soutien inconditionnel et tes prières constantes, qui m'ont donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de ce travail.

À mes chères sœurs et frères, Asmaa, Djihed, Mokhtar et Amir

Pour votre tendresse, vos sourires, votre présence réconfortante et vos mots d'encouragement. Vous avez su adoucir les jours difficiles et partager avec moi la joie de chaque petite victoire.

*Ce travail est aussi le vôtre, car il porte en lui un peu de tout ce que vous m'avez donné :
l'amour, la patience et la foi en moi.*

Je voudrais particulièrement remercier ma sœur, Aïcha, qui a été pour moi une force vitale. Tu as été mon ancre et mon souffle : telle une étoile fidèle, ton encouragement inlassable a illuminé chaque étape de mon chemin doctoral, et cette réussite est le fruit précieux de ta foi en moi.

À mes chers neveux et nièces,

Athir, Mounira, Ayoub, Wael, Nadir, Loujaian, Hanaa, Yousra, Youcef, Zakaria et Amira.

Vous êtes ma plus belle source de joie et d'inspiration.

Vos rires, votre innocence et votre curiosité me rappellent chaque jour la beauté simple de la vie.

À tous mes amis et collègues, qui ont été des sources d'inspiration, d'encouragement et de soutien moral pendant ces années, et sans qui ce chemin n'aurait pas été aussi enrichissant.

الملخص

في إطار البحث عن بدائل طبيعية لمكافحة العدوى الميكروبية، تُقيم هذه الدراسة الإمكانيات العلاجية للزيوت العطرية لأوراق نباتي *Schinus molle* و *Eucalyptus globulus* على السلالات السريرية والمتحورة من المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) مع دراسة تأثيرها على عوامل الضراوة المرتبطة بآلية استشعار النصاب (Quorum Sensing, QS).

جُمعت العزلات السريرية من سوانل بيولوجية مختلفة، وتم تحديد جنسها وصنفها باستخدام طرائق فينوتيبية وجينوتيبية . تم تحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية باستخدام مطيافية تحويل فورييه بالأشعة تحت الحمراء (FT-IR) وكروماتوغرافيا الغاز المزدوجة مع مطياف الكتلة (GC-MS) كشفت التحاليل عن وجود 20 مركبًا في زيت *S. molle*، يهيمن عليها الليمونين (35.82%) وألفا-فيلاندين (19.13%)، بينما احتوى الزيت العطري لـ *E. globulus* على 14 مركبًا، أهمها اليوكالبيتول (45.20%) والأوسيمين (25.42%).

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية بطريقة الانتشار على الوسط المغذي، وأظهرت النتائج استجابة واضحة تعتمد على الجرعة لكلا الزيتين. فقد حقق زيت *S. molle* منطقة تثبيط قدرها 0.1 ± 34.33 مم، بينما بلغ زيت *E. globulus* منطقة تثبيط قدرها 0.57 ± 50.33 مم عند تركيز 200 ملغ/مل. كما أظهر كلا الزيتين نشاطًا قويًا مضادًا للضراوة من خلال تعطيل آليات استشعار النصاب (QS) لدى *Chromobacterium violaceum* (CECT 494)، مع تقليل ملحوظ لإنتاج staphyloxanthine، exopolysaccharides، slime، و biofilm، حيث بلغ أقصى تثبيط 92.87%.

أبرزت تحليلات الالتحام الجزيئي التفاعلات القوية بين بعض مكونات الزيوت العطرية وبروتين AgrA المسؤول عن تنظيم نظام استشعار النصاب، مما يدعم قدرتها على تعطيل مسارات الضراوة.

بشكل عام، يتمتع الزيتان بخصائص تكمل بعضها البعض؛ حيث يتميز زيت *S. molle* بنشاطه المضاد للبكتيريا المباشر الممتاز بالإضافة إلى قدرته على استهداف بروتينات QS، في حين يظهر زيت *E. globulus* نشاطًا مضادًا لـ QS أكثر اتساقًا، ولا سيما من خلال التثبيط الملحوظ لإنتاج staphyloxanthine، و biofilm، و exopolysaccharides عند تركيزات أقل.

وتعزز هذه النتائج الدور الواعد لهذين الزيتين كعوامل طبيعية قد تمثل بدائل محتملة للمضادات الحيوية التقليدية في مواجهة العدوى المقاومة.

الكلمات المفتاحية: زيت عطري، *Schinus molle*، *Eucalyptus globulus*، *Staphylococcus aureus*، عامل الضراوة، Biofilm

Résumé

Dans le cadre de l'utilisation des plantes médicinales comme alternatives naturelles aux infections microbiennes, cette étude évalue le potentiel des huiles essentielles des feuilles de *Schinus molle* L. et d'*Eucalyptus globulus* L. sur des souches cliniques et mutantes de *Staphylococcus aureus*, tout en analysant leur effet sur les facteurs de virulence liés au quorum sensing (QS). Les isolats cliniques de *S. aureus* ont été prélevés à partir de différents liquides biologiques et identifiés par des méthodes phénotypiques et génotypiques.

La composition chimique des huiles essentielles (HEs) a été déterminée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les analyses ont révélé la présence de 20 composés dans l'huile de *S. molle*, dominés par le limonène (35,82 %) et l' α -phellandrène (19,13 %). L'huile essentielle d'*E. globulus* contenait 14 composés, dont les principaux étaient l'eucalyptol (45,20 %) et l'*o*-cymène (25,42 %).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque, montrant une réponse nettement dose-dépendante pour les deux huiles. *S. molle* a généré une zone d'inhibition de $34,33 \pm 0,1$ mm, tandis qu'*E. globulus* a atteint $50,33 \pm 0,57$ mm à la concentration de 200 mg/mL. Les deux HEs ont également montré une forte activité antivirulence en perturbant les mécanismes du QS, confirmée par leur effet inhibiteur sur *Chromobacterium violaceum* (CECT 494). Elles ont significativement réduit la production de staphyloxanthine, d'exopolysaccharides, de slime et de biofilm, avec une inhibition maximale atteignant 92,87 %.

Les analyses de docking moléculaire ont mis en évidence de fortes interactions entre certains constituants des HEs, notamment l'acétate de guaïol et la protéine AgrA, impliquée dans la régulation du QS, soutenant ainsi leur potentiel anti-QS.

Globalement, les deux huiles présentent des profils complémentaires : *S. molle* se distingue par une excellente activité antibactérienne directe et une capacité à interagir efficacement avec les cibles moléculaires du QS, tandis qu'*E. globulus* manifeste une activité anti-QS plus régulière, notamment par l'inhibition marquée des pigments de virulence, du biofilm et des exopolysaccharides à des concentrations plus faibles.

Ces résultats renforcent l'intérêt prometteur des HEs de *S. molle* et d'*E. globulus* comme agents naturels susceptibles de constituer des alternatives aux antibiotiques classiques dans la lutte contre les bactéries résistantes.

Mots clés: Huile essentielle, *Schinus molle* L., *Eucalyptus globulus* L., *Staphylococcus aureus*, facteur de virulence, quorum sensing, docking moléculaire.

Abstract

In the context of medicinal plant exploitation as natural alternatives to microbial infections, this study aimed to evaluate the biological potential of essential oils extracted from the leaves of *Schinus molle* L. and *Eucalyptus globulus* L. against clinical and mutant strains of *Staphylococcus aureus*, while analyzing their effects on virulence factors associated with quorum sensing (QS). Clinical isolates were collected from various biological fluids and identified using phenotypic and genotypic methods. The chemical composition of the essential oils (EOs) was determined using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The analyses revealed the presence of 20 compounds in *S. molle* essential oil, dominated by limonene (35.82%) and α -phellandrene (19.13%). *E. globulus* essential oil contained 14 compounds, with eucalyptol (45.20%) and o-cymene (25.42%) as the major constituents.

The antibacterial activity of the essential oils was evaluated using the disc diffusion method, showing a clear dose-dependent response for both oils. *S. molle* produced an inhibition zone of 34.33 ± 0.1 mm, whereas *E. globulus* reached 50.33 ± 0.57 mm at 200 mg/mL. Both EOs also demonstrated strong antivirulence activity by disrupting QS mechanisms, confirmed by their inhibitory effect on *Chromobacterium violaceum* (CECT 494). They significantly reduced the production of staphyloxanthin, exopolysaccharides, slime, and biofilm, with maximum inhibition reaching 92.87%.

Molecular docking analyses highlighted strong interactions between certain EO constituents, particularly guaiol acetate, and the QS regulatory protein AgrA, supporting their potential anti-QS properties. Overall, the two essential oils exhibited complementary activity profiles: *S. molle* stood out for its excellent direct antibacterial action and its ability to interact effectively with QS molecular targets, whereas *E. globulus* showed a more consistent anti-QS effect, particularly through marked inhibition of virulence pigments, biofilm, and EPS at lower concentrations.

These findings reinforce the promising potential of *S. molle* and *E. globulus* essential oils as natural agents that may serve as alternatives to conventional antibiotics in combating resistant bacteria.

Key words: Essential oil, *Schinus molle* L., *Eucalyptus globulus* L., *Staphylococcus aureus*, Virulence factor, Quorum sensing, Molecular docking.

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations.....	iv
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
ChapitreI : L'antibiorésistance	
I.1.Facteurs favorisant l'antibiorésistance.....	4
I.2. Origine de la résistance bactérienne.....	5
I.2.1. Résistance naturelle.....	5
I.2.2. Résistance acquise	5
I.3. Les bactéries multirésistantes	6
I.4. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	7
I.4.1. Limitation de l'absorption des médicaments.....	7
I.4.2. Modification de la cible	8
I.4.3. Inactivation des médicaments.....	8
I.4.4. Le mécanisme d'efflux actif.....	9
I.5.Les antibiotiques et leur mécanisme d'action.....	10
I.5.1. Inhibition de la réplication de l'ADN.....	11
I.5.2. Inhibition de la biosynthèse des protéines.....	12
I.5.2.1. Inhibiteurs de la sous-unité 30S.....	13
I.5.2.2. Inhibiteurs de la sous-unité 50s.....	13
I.5.3. Antibiotiques ciblant la structure de la membrane cellulaire.....	14
I.5.3.1. Les polypeptides tensio-actifs.....	14
I.5.3.2. Les polypeptides non tensio-actifs.....	14
I.5.4. Antibiotiques ciblant la paroi cellulaire.....	14
I.5.5. Inhibition du métabolisme de l'acide folique.....	16
ChapitreII : <i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>II.1.Staphylococcus aureus</i>	20
II.2. Taxonomie	20
II.3. Origines et établissement de l'infection.....	20
II.4. Mécanisme du quorum sensing chez <i>S. aureus</i>	23
II.5. Les facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	24

II.5.1. Protéines de surface (adhésines)	24
II.5.1.1. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules	24
II.5.1.2. Protéines à motif NEAT	25
II.5.1.3. Famille de faisceaux à trois hélices.....	25
II.5.1.4. Famille de répétitions G5-E	26
II.5. 2. Les toxines.....	26
II.5.2.1. Les toxines porogènes (PFT)	26
II.5.2.2. Toxines exfoliatives (TE)	27
II.5.2.3. Les super antigènes (SAg)	28
II.5.2.3. 1.Entérotoxines staphylococciques (ES)	29
II.5.2.3. 2.Toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1)	29
II.5.3. Formation de Slime	31
II.5.4. La staphyloxanthine	31
II.5.5. La motilité.....	32
II.5.6. Les exopolysaccharides (EPS).....	32
II.5.7. Formation de Biofilm	32
II.6. Génétique de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
II.6.1.Résistance aux antibiotiques codés par un plasmide.....	35
II.6.2.Îlots de pathogénicité et génomique de <i>S. aureus</i>	36
II.6.3. Chromosome à cassette staphylococcique.....	37
II.6.4. Autres éléments transposables.....	37

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

III.1. <i>Schinus molle</i>	40
III.1.1. Généralité sur la plante <i>S. molle</i>	40
III.1.2. Répartition géographique et habitat.....	41
III.1.3. Origine et aspect botanique.....	41
III.1.4. Classification botanique	42
III.1.4.1. Classification taxonomique.....	42
III.1.4.2. Nomenclature.....	42
III.1.5. Composition biochimique de <i>S. molle</i>	42
III.6. Propriétés biologiques de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	44
III.2. <i>Eucalyptus globulus</i>	46
III.2.1. Généralité sur la plante <i>E. globulus</i>	46

III.2.2. Répartition géographique et habitat.....	46
III.2.3. Origine et aspect botanique.....	47
III.2.4. Classification botanique.....	48
	48
III.2.4.1. Classification taxonomique.....	
III.2.4.2. Nomenclature.....	49
III.2.5. Composition biochimique d' <i>E. globulus</i>	49
III.2.6. Propriétés biologiques de l'Huile essentielle d' <i>E. globulus</i>	51

Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I. Matériels et Méthodes.....	52
I.1. Objectifs	52
I.3. Prélèvement des souches bactériennes.....	52
I.3.1. Isolement et identification des souches de <i>S. aureus</i>	54
I.3.1.1. Pré identification de <i>S.aureus</i>	54
I.3.1.2. Test de catalase.....	54
I.3.1.3. Test de coagulase.....	54
I.3.1.4. Recherche de la désoxyribonucléase (ADNase)	54
I.3.2. Détection de la production de slime.....	55
I.3.2.2. Etude de la formation de biofilm.....	55
I.3.3. Identification moléculaire par séquençage de l'ARNr 16S.....	55
I.3.4. Test d'antibiogramme.....	56
I.4. Matériel végétal.....	57
I.4.1. Récolte.....	57
I.4.2. Extraction des huiles essentielles.....	58
I.4.3. Calcul des rendements d'extraction.....	59
I.4.4. Analyse des caractéristiques physicochimiques des HEs.....	59
I.4.4.1. Densité relative à 20°C (NF ISO 279, 1999)	60
I.4.4.2. Indice de réfraction (NF ISO 280, 1999)	60
I.4.4.3. Pouvoir rotatoire (NF ISO 592, 1999)	60
I.4.4.4. Indice d'acide (NF ISO 1242, 1999)	60
I.4.4.5. Indice d'ester (NF ISO 709, 2002)	60
I.4.5. Analyse des huiles essentielles par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	

(FTIR)	61
I.4.6. Analyse chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	61
I.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	62
I.5.1. Diffusion sur disque	62
I.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	63
I.6. Inhibition du Quorum sensing	63
A- Production de violacéine	63
B- Quantification de la violacéine	64
I.7. Détermination de l'effet des HEs sur les facteurs de virulences.....	64
I.7.1. L'effet sur la production de staphyloxanthine.....	64
I.7.2. Inhibition des Exopolysaccharide (EPS)	65
I.7.3. Inhibition de la motilité.....	65
I.7.4. Inhibition de la production de Slime	66
I.7.5. Inhibition de la formation du biofilm.....	66
I.7.6. Observation de l'inhibition du biofilm par microscopie optique.....	67
I.8. Etude <i>in Silico</i>	67
I.8.1. Interactions composés-cibles (STITCH-STRING)	67
I.8.2. Le docking moléculaire.....	67
I.8.3. Prédiction ADMET.....	69
I.9. Analyse statistique.....	69

Chapitre II: Résultats et discussion

II.1. Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
II.1.1. Pré identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
II.1.3. Identification biochimique	71
II.1.4. Identification moléculaire.....	72
II.1.5. Evaluation de la sensibilité de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques.....	74
II.1.6. Capacité des souches à la production du slime.....	75
II.1.7. Capacité des souches à la production du biofilm.....	76
II.2. Plantes médicinales.....	76
II.2.1. Rendement d'extraction et propriétés sensorielles des huiles essentielles (HEs).....	76
II.2.2. Propriétés physico-chimie des huiles essentielles étudiées.....	78
II.2.3. Caractérisation phytochimiques des huiles essentielles.....	79

II.2.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	79
II.2.3.1.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des HE de <i>S. molle</i>	80
II.2.3.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i>	81
II.2.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse (GC-MS).....	83
II.2.3.2.1. <i>S. molle</i>	83
II.2.3.2.2. <i>E. globulus</i>	84
II.3. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HEs).....	86
II.3.1. Étude de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>S. molle</i>	86
II.3.1.1. Méthode de diffusion.....	86
II.3.1.2.1. Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing de <i>Schinus. molle</i> L.....	88
II.3.1.2.2. Inhibition de la violacéine	89
II.3.1.3. L'activité antivirulence de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	89
II.3.1.3.1. Inhibition de Staphyloxanthin.....	89
II.3.1.3.2. Inhibition de Slime.....	91
II.3.1.3.3. Inhibition de la mobilité	91
II.3.1.3.4. Inhibition des EPS.....	93
II.3.1.3.5. Inhibition du Biofilm	93
II.3.2. Étude de l'activité antibactérienne de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	94
II.3.2.1. Méthode de diffusion.....	94
II.3.2.2.1. Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing de l'HE de l' <i>E. globulus</i>	96
II.3.2.2.2. Quantification de la violacéine.....	97
II.3.2.3. Effet de l'HE d' <i>E. globulus</i> sur les facteurs de virulence	98
II.3.2.3.1. L'inhibition de Staphyloxanthin	98
II.3.2.3.2. L'inhibition de la motilité.....	98
II.3.2.3.3. L'inhibition de slime.....	99
II.3.2.3.4. L'inhibition des EPS.....	100
II.3.2.3.5. Inhibition de la formation de biofilm	102
II.3.2.3.6. Observation microscopie optique.....	101
II.4. Étude <i>in silico</i>	103
IV.1. ADMET.....	103
IV.1.1. Le profil d'ADMET des molécules bioactifs de l'HE de <i>S. molle</i>	103
IV.1.2. Le profil d'ADMET des molécules bioactifs de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i>	111

IV.2.Interactions des composants des huiles essentielles avec les protéines de <i>Staphylococcus aureus</i> (STRING /STITCH).....	117
IV.3.Docking moléculaire.....	123
IV.3.1.Docking moléculaire de l'interaction des composants de l'HE de <i>S. molle</i> avec AgrA de <i>S. aureus</i>	123
IV.3.2. Docking moléculaire de l'interaction des composants de l'HE d' <i>E.globulus</i> avec AgrA de <i>S. aureus</i>	128
Discussion générale	131

Conclusion générale

Conclusion et perspectives	135
Référence.....	138
Annexe.....	177
Publication	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mécanisme d'action, spectre d'activité, mécanisme, taux de résistance et indication des principales classes thérapeutiques.....	17
Tableau 2 : Taux de portage nasal de MRSA et MSSA selon les pays et les groupes de population étudiés.	21
Tableau 3 : Toxines sécrétées par <i>S. aureus</i>	30
Tableau 4 : Classification taxonomique de <i>Schinus molle</i>	42
Tableau 5: La détermination de la composition phytochimiques des extraits méthanoliques des graines et feuilles de <i>S.molle</i> par GC-MS	43
Tableau 6 : Classification taxonomique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	48
Tableau7: Composition phytochim-ique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	50
Tableau 8: Détails sur l'origine d'isolement des souches microbiens étudiées.....	53
Tableau 9: Les souches utilisées dans cette étude proviennent du Département de pharmacologie et de toxicologie, Collège de pharmacie, Université du Roi Saud, Riyad, Arabie saoudite.	53
Tableau10: Situations géographiques des stations de récolte.....	58
Tableau11 : Caractéristique biochimiques des isolats de <i>S. aureus</i>	72
Tableau 12 : Identification moléculaire des souches isolées de <i>S .aureus</i>	73
Tableau 13: Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques.....	74
Tableau14: Rendement d'extraction et propriétés sensorielles des huiles essentielles	77
Tableau 15: Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées.....	78
Tableau 16: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	83
Tableau 17: Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i>	85
Tableau 18. Effet de l'huile essentielle de <i>S. molle</i> sur la production de slime.....	91
Tableau 19 : Effet de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la production de slime.....	99
Tableau 20 : les scores d'interactions entrent les protéines de <i>S.aureus</i>	104
Tableau 21 : les scores et les interactions entrent les composant de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> et les protéines de <i>S.aureus</i>	106
Tableau 22 : les scores et les interactions entrent les composant de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> et les protéines de <i>S.aureus</i>	107
Tableau 23: Énergies de liaison libres avec les interactions d'acides aminés des	

composés bioactifs des composants de l'huile essentielle de <i>S. molle</i> dans les sites actifs d'AgrA.....	109
Tableau 24 : Énergies de liaison libres avec les interactions d'acides aminés des composés bioactifs des composants de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> dans les sites actifs d'AgrA.....	114
Tableau 25 : Caractéristiques ADME des molécules de l'huile essentielle de <i>S.molle</i>	119
Tableau 26: Etude de toxicité du composé de l'huile essentielle de <i>S.molle</i>	120
Tableau 27 : Caractéristiques ADME des molécules de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i>	126
Tableau 28 : Etude de toxicité du composé de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i>	127

Figure 1 : Différents types de résistance aux antibiotiques	8
Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques	11
Figure 3: Mécanisme d'action moléculaire des antibiotiques inhibant la réplication de l'ADN	12
Figure 4: Antibiotiques ciblant la paroi cellulaire.....	15
Figure 5: Interaction entre <i>S. aureus</i> et l'épithélium de l'hôte: mécanismes de colonisation et de perturbation de la barrière	22
Figure 6 : le système de Quorum sensing chez <i>S. aureus</i>	24
Figure 7 : Mécanisme d'action de l'alpha-hémolysine	27
Figure 8 : l'invasion bactérienne et la formation de cloques provoquées par les ET staphylococciques.	28
Figure 9: Processus de formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	33
Figure 10 : Acquisition d'EGM par <i>S. aureus</i>	35
Figure 11 : <i>Schinus molle</i> ; (a) : arbre, (b) : fruits.....	40
Figure 12 : Répartition géographique de <i>Schinus molle</i>	41
Figure 13 : Arbre mature d' <i>Eucalyptus globulus</i>	47
Figure 14: Répartition géographique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	48
Figure15:Situation géographique des sites d'échantillonnage au niveau de la Wilaya de Mascara.	57
Figure 16: Feuilles des plantes étudiées: <i>Schinus molle</i> (a) et <i>Eucalyptus globulus</i> (b).	58
Figure 17 : Dispositif Clevenger pour l'extraction des HEs.....	59
Figure 18: Aspect culturel de <i>Chromobacterium violaceum</i> CECT 494 sur le milieu Luria Burtani	64
Figure 19: Principe du docking moléculaire.....	68
Figure 20 : La croissance de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman.	70
Figure 21: Observation microscopique des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> après la coloration de Gram.	71
Figure 22 : Arbre phylogénétique mettant en évidence la position des souches de <i>S. aureus</i> par rapport aux autres souches typiques au sein des Staphylococcaceae généré par MEGA.	73
Figure23 : Production de slime sur le milieu rouge congo.	75
Figure 24 : Le phénotype du biofilm annulaire formé par les souches de <i>S. aureus</i> et	

colorés au cristal violet dans les tubes en verre.	76
Figure 25 : L'huile essentielle: a) <i>Schinus molle</i> , b) d' <i>Eucalyptus globulus</i>	77
Figure 26: Analyse FTIR de l'huile essentielle de <i>Schinus molle</i>	81
Figure 27: Analyse FTIR de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	82
Figure28: Diamètre d'inhibition par diffusion en milieu gélosé de l'huile essentielle de <i>S. molle</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Figure 29 : L'effet anti quorum sensing de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	88
Figure 30 : l'effet de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la production de la violaceine.....	89
Figure31: Effet de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la production de staphyloxanthin.	90
Figure 32 : L'effet de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la mobilité de <i>S.aureus</i>	92
Figure33 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la mobilité de <i>S.aureus</i>	92
Figure34 : Effet du l'huile essentielle de <i>S. molle</i> sur la production d'EPS chez <i>S. aureus</i>	93
Figure 35 : Effet de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> sur la production du Biofilm chez <i>S.aureus</i>	94
Figure 36: Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> contre les souches de <i>S. aureus</i>	95
Figure 37: L'effet anti quorum sensing de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i>	97
Figure 38: Effet de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> sur la production de violacéine.....	97
Figure 39 : Effet de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> sur la production de la staphyloxanthine.....	98
Figure 40 : Effet de l'huile d' <i>E.globulus</i> sur la motilité de <i>S.aureus</i>	99
Figure41 : Effet de l'huile d' <i>E.globulus</i> sur la production de slime sur gélose rouge Congo. (a,b) : producteur de slime positif (apparition de couleur noire autour des colonies), (c,d) : producteur de slime négatif (absence de couleur noire).....	100
Figure 42 : Effet de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> sur la production des EPS.....	101
Figure 43 : Effet de l'huile essentielle d' <i>E.globulus</i> sur la production du Biofilm chez <i>S.aureus</i>	102
Figure 44 : Observation de l'inhibition de la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i> traité par l'huile d' <i>E.globulus</i> au microscope optique (100X).	102

Figure 45 : Relations topologiques du réseau entre les protéines de <i>S.aureus</i>	103
Figure 46 : Relations topologiques du réseau entre les composés des huiles essentielles et les protéines de <i>S.aureus</i> . A : Résultats STITCH avec les composants de <i>S.molle</i> , B : Résultats STITCH avec les composants d' <i>E.globulus</i>	105
Figure 47: Modèle de site de fixation d'AgrA à l'aide du docking moléculaire: représentation 2D (à droite) et 3D (à gauche) des modes de liaison des cinq meilleurs ligands au site actif de l'opéron d'AgrA (code PDB : 4G4K). (a) Acétate de gäiol. (b) : β -copaène. (c) : α -gurjunene. (d) : Tau-cadinol. (e) : γ -cadinene.	112
Figure 48 : Superposition du champ de liaison à l'ADN des dérivés amarrés de <i>S. aureus</i> AgrA (PDB ID: 3BS1); composé (Ylangenal) (cyan), composé (4-terpinéol) (vert clair), composé (eucalyptol) (rose), composé 1(10), 11-éremophiladién-9-ol.	114
Figure 49 : Modelisation d'amarrage (a) 1(10),11-eremophiladien-9-ol; b) d'ylangenal; c) 4-terpinéol; d) eucalyptol) dans le champ de liaison de l'ADN de l'AgrA.	115
Figure 50 : Le modèle d'œuf de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	122
Figure 51 : Les polygones de biodisponibilité de l'huile essentielle de <i>S.molle</i> identifient les constituants en fonction de leurs paramètres physico-chimiques en utilisant les caractéristiques ADMET.	124
Figure 52: Les polygones de biodisponibilité de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> identifient les constituants en fonction de leurs paramètres physico-chimiques en utilisant les caractéristiques ADME.	129
Figure 53 : Le modèle d'œuf d' <i>E.globulus</i>	130

Liste des abréviations

ADMET: Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité

AFNOR: Association Française de Normalisation

Agr : Accessory gene regulator

ANOVA: Analyse de la variance

ATCC: American Type Culture Collection

Arg : Arginine

Asn :Asparagine

Asp :Acide Aspartique

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

CMI: Concentration minimale inhibitrice

Cys :Cystéine

DMSO: DiMethyl Sulfoxyde EPS: Exopolysaccharides

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier .

GCMS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Glu :Acide Glutamique

His :Histidine

Ile :Isoleucine

Leu :Leucine

Lys :Lysine

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé

PBP : Protéines de liaison à la pénicilline

PCR: Polymérase Chain Réaction

Phe :Phénylalanine

Ser :Sérine

Thr :Thréonine

Tyr :Tyrosine

Val :Valine

Introduction

Introduction

À l'échelle mondiale, les antibiotiques ont révolutionné la médecine moderne, en jouant un rôle central dans la prévention et la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, leur usage répété a fait émerger une préoccupation majeure : la résistance bactérienne. Ce constat a transformé les approches de recherche, les scientifiques se concentrant désormais sur l'étude de l'antibiorésistance plus que celles de l'antibiothérapie. Il devient primordial de surveiller ces phénomènes de résistance développée par les bactéries lors de l'assimilation des antibiotiques ainsi que leurs modalités d'utilisation en raison de bien d'adapter les pratiques de prescription pour garantir des traitements appropriés et efficaces (Laibi et Zaouani, 2023).

L'utilisation des plantes médicinales en tant qu'agents antimicrobiens remonte à l'Antiquité et attribuées à leur capacité à biosynthétiser des métabolites secondaires aux propriétés antibactériennes. Ces composés phytochimiques exercent une activité bactériostatique ou bactéricide, permettant à la plante elle-même de se protéger contre les agressions microbiennes dans leur environnement naturel. Parmi ces substances bioactives, les huiles essentielles (HE) et leurs constituants moléculaires présentent des mécanismes d'action multiples et hautement spécifiques vis-à-vis des microorganismes pathogènes (Bouyahya *et al.*, 2017).

Parmi les agents pathogènes d'intérêt clinique majeur, *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif, représente l'un des principaux responsables d'infections humaines. Sa pathogénicité repose sur la sécrétion d'une variété d'entérotoxines staphylococciques et diverses exotoxines responsables de la stimulation des réponses immunitaires exacerbées se manifestant par des processus inflammatoires locales ou systémiques. Au niveau cellulaire *S. aureus* induit différentes voies de mort cellulaire programmée chez l'hôte, incluant la pyroptose, l'apoptose, la nécroptose et l'autophagie létale. L'implication pathogénique de *S. aureus* a également été documentée dans sa contribution à l'aggravation de nombreuses pathologies, tels que les dermatoses inflammatoires (dermatite atopique, psoriasis), les pathologies respiratoires chroniques (fibrose kystique pulmonaire, asthme allergique), intoxication alimentaire, sarcoïdose, affections auto-immunes (sclérose en plaques) et infections ostéo-articulaires (ostéomyélite) (Chen *et al.*, 2022).

Au-delà de sa virulence intrinsèque, l'émergence et la dissémination de souches de *S. aureus* multirésistantes aux antibiotiques constitue une menace majeure pour la santé publique mondiale, classée prioritaire par l'OMS. Face à cette crise thérapeutique, le développement des

Introduction

stratégies antimicrobiennes alternatives s'impose comme une nécessité urgente. Parmi les approches les plus prometteuses figurent les molécules bioactives d'origine végétale, notamment les huiles essentielles qui représentent des pistes thérapeutiques prometteuses en raison de leurs mécanismes d'action multiples et de leur faible propension à induire des résistances microbiennes (Amal *et al.*, 2024).

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, une étude approfondie a été menée sur les espèces *Schinus molle* et *Eucalyptus globulus*. Ce choix se justifie par le fait que ces plantes sont riches en composés actifs, notamment les huiles essentielles, ainsi que par la diversité et l'importance de leurs activités biologiques (Atmani-Merabet, 2018, Ilgun *et al.*, 2023, Cmikova *et al.*, 2023).

Schinus molle, plante médicinale appartenant à la famille des Anacardiaceae, est largement distribuée à travers le monde, y compris l'Algérie. L'huile essentielle, extraite de ses fruits et feuilles est traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreuses affections telles que l'aménorrhée, la bronchite, la gingivite, la gonorrhée, la goutte, la tuberculose, les tumeurs, les ulcères, l'urétrite, les verrues, les infections urogénitales, les rhumatismes et l'ophtalmie (Ilgun *et al.*, 2023).

De même, *Eucalyptus globulus*, appartenant à la famille Myrtaceae, est une autre plante médicinale de grande importance, particulièrement répandue en Algérie. Son bois, sa gomme, sa pulpe et surtout son huile essentielle sont largement exploités dans les domaines médicaux et cosmétique. L'huile essentielle extraite de cette espèce se distingue par sa richesse en composés bioactifs à fort potentiel antimicrobien. Elle présente des effets thérapeutiques notables dans de diverses affections telles que la rhinite, la bronchite, la fièvre, la grippe, les douleurs musculaires, la toux, la pyorrhée, l'anodyne, les brûlures, la diarrhée, le cancer, la désinfection et la malaria. Par ailleurs, elle possède des propriétés antiseptiques, anti-inflammatoire, antibactériennes et antioxydantes remarquables (Cmikova *et al.*, 2023 ; Sharma *et al.*, 2021).

Cette étude vise à :

- Caractériser et identifier les molécules bioactives des deux huiles essentielles extraites des deux plantes en utilisant la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) et la Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS).

Introduction

- Évaluer les propriétés antibactériennes, anti-virulentes et anti-quorum sensing des deux huiles essentielles.

- Étudier *in silico* le mode d'action des composants isolés de chaque huile par le docking moléculaire.

- Évaluer la toxicité et l'alternative aux médicaments de ces composants par le profil ADMET.

Le présent travail est structuré en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique portant sur les souches bactériennes étudiées, sur les plantes utilisées (*Schinus molle* et *Eucalyptus globulus*) et sur les huiles essentielles, en abordant leurs caractéristiques, leurs propriétés biologiques ainsi que leurs applications.

- Le deuxième chapitre décrit les différentes méthodes expérimentales mises en œuvre dans ce travail, notamment l'isolement et l'identification des souches de *S. aureus*, ainsi que l'extraction des huiles essentielles des feuilles par hydrodistillation et l'évaluation de leur activité antibactérienne.

- Le troisième chapitre présente et discute les résultats obtenus concernant le rendement d'extraction et l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis de *S. aureus*, lesquels sont interprétés à la lumière des données de la littérature.

Enfin, le travail se termine par une conclusion générale mettant en évidence les principaux résultats et par des perspectives suggérant des pistes de recherche futures.

Synthèse bibliographique

Chapitre I:

L'antibiorésistance

Chapitre I : L'antibiorésistance

Les antibiotiques constituent l'une des découvertes thérapeutiques les plus significatives pour la santé humaine en médecine moderne, en raison de leur rôle déterminant dans la prévention et le traitement des infections bactériennes et fongiques. Leur utilisation a largement contribué à la réduction de la mortalité et de la morbidité à l'échelle mondiale. Ces composés, appartenant à la famille des molécules organiques d'origine naturelle ou synthétique, se caractérisent par une activité anti-microbienne spécifique.

Cependant, l'émergence précoce de résistances a marqué un tournant décisif dans l'histoire de l'antibiothérapie, transformant ce qui paraissait être une solution définitive en un défi permanent pour la médecine moderne.

Aujourd'hui, la propagation rapide des bactéries multirésistantes, ainsi que le manque de nouveaux antibiotiques représentent une menace mondiale, compromettant l'efficacité des traitements disponibles et entraînant une augmentation de la morbidité, de la mortalité et des coûts de santé publique (Prestinaci et *al.*, 2015; Ferdinand et *al.*, 2024).

La lutte contre l'antibiorésistance est devenue une priorité essentielle de la santé publique mondiale, nécessitant des efforts rapides et coordonnés de la part des autorités gouvernementales, des professionnels de santé, des chercheurs et du grand public (Padiyara et *al.*, 2018). L'Organisation mondiale de la Santé et d'autres institutions sanitaires internationales considèrent désormais l'antibiorésistance comme l'un des défis les plus critiques pour la communauté médicale et scientifique à l'échelle internationale du XXI^e siècle (Cloeckaert, 2017; Wu et *al.*, 2017, WHO, 2017).

À travers les différentes étapes de l'étude de l'antibiorésistance, il apparaît que ce phénomène a été caractérisé par plusieurs disciplines clinique, bactériologique et génétique. De ce fait, il n'existe pas une définition unique de la résistance, mais plutôt plusieurs approches. Dès 1945, Alexander Fleming, lors de son discours de réception du Prix Nobel, avait déjà alerté la communauté scientifique sur les risques liés à une utilisation inappropriée des pénicillines, en particulier le sous-dosage, soulignant les conséquences potentiellement graves qu'un tel usage pouvait engendrer aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Fleming, 1945).

En 1961, un comité d'experts réunis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait proposé deux définitions de la résistance bactérienne (Chabbert, 1982) :

- Une souche est considérée comme résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle peut tolérer est significativement plus élevée que celle pouvant être atteinte *in vivo*.

Chapitre I : L'antibiorésistance

- Une souche microbienne ou une bactérie est également qualifiée de résistante lorsqu'elle est capable de croître à des concentrations d'antibiotique nettement supérieures à celles qui inhibent la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus d'une même culture (Guillot, 1989).

I.1. Facteurs favorisant l'antibiorésistance:

Bien que l'émergence de la résistance aux antibiotiques au niveau mondial soit un phénomène biologique naturel lié à des facteurs biologiques et microbiologiques, tels que la transmission horizontale de gènes de résistance (plasmides, transposons, intégrons), la persistance de réservoirs bactériens dans les populations humaines, animales et environnementale et la diversité microbienne favorisant l'émergence de nouvelles résistances. Toutefois, dans les pays en développement, plusieurs facteurs contribuent non seulement à accélérer ce processus de résistance, mais également à favoriser sa propagation (Byarugaba, 2004).

Ces facteurs peuvent être liés à des déficiences dans le système médical (personnels, infrastructures), tels que :

- Les facteurs socio-économiques défavorables associent la malnutrition, l'inaccessibilité à l'eau potable et le niveau d'éducation sanitaire limité des populations, ce qui augmente le risque d'acquérir des infections et le risque de transmission des bactéries résistantes.

- L'usage excessif et non contrôlé des antibiotiques par automédication fréquente sans prescription médicale, prescription inappropriée par certains praticiens liés à des erreurs de diagnostic étiologique, choix inadéquat, durée trop courte, sous-dosage par l'isolement et l'identification de l'agent infectieux, soit par des tests de sérologie permettant d'établir le contact avec le pathogène (Kempf et al., 2012), ou vente libre d'antibiotiques en pharmacie et sur les marchés parallèles (Laxminarayan et Duse, 2006).

- Les conditions d'hygiène déficientes dans les hôpitaux qui favorisent les infections nosocomiales, la gestion inadéquate des eaux usées contaminées par des résidus d'antibiotiques, le contact direct avec des animaux porteurs de bactéries résistantes, ainsi que les pollutions environnementales par les effluents industriels et agricoles,

- Utilisation d'antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale (promoteurs de croissance, prévention non justifiée).

Chapitre I : L'antibiorésistance

- Facteurs liés à l'absence de la réglementation et à la surveillance pour l'acquisition des antibiotiques.
- L'automédication et l'ignorance favorisent le partage d'antibiotiques entre individus basé sur des signes cliniques similaires.
- Manque de programmes de pharmacovigilance, par exemple pour une même molécule, on peut retrouver plusieurs formes galéniques distribuées par des laboratoires différents. De plus, la variété des formes galéniques, ou mauvaise qualité et la mauvaise conservation des médicaments peut entraîner des confusions chez les prescripteurs et les patients dans l'utilisation appropriée de ces antibiotiques.
- Aussi, l'introduction et l'utilisation de l'antibiothérapie en médecine vétérinaire ont largement contribué à l'amélioration de la productivité et la santé animale, toutefois, leur usage prophylactique ou thérapeutique contre diverses maladies infectieuses, ont progressivement favorisé l'émergence et la sélection de résistances à plusieurs familles d'antibiotiques, aussi bien chez les microorganismes pathogènes que commensaux présents dans les différentes flores de l'organisme des animaux traités (Harbottle et *al.*, 2006).

I.2. Origine de la résistance bactérienne

I.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle est le type de résistance le plus simple. Il s'agit d'une caractéristique fixe d'une espèce, d'une souche ou d'un groupe entier de bactéries. La capacité de ces microorganismes à résister naturellement à certains groupes d'antibiotiques est probablement due à l'absence de récepteur spécifique pour l'antibiotique, à une faible affinité pour sa cible, à l'imperméabilité de la paroi cellulaire, ou encore à la production d'enzymes inactivatrices (Irving et *al.*, 2008).

I.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise est le résultat d'un processus évolutif par lequel les microorganismes s'adaptent aux antibiotiques par plusieurs mécanismes, notamment l'altération de la cible du médicament par des mutations et le transfert horizontal de nouveaux gènes/étrangers, appelés gènes de résistance (Schwarz et *al.*, 2017). Elle peut être acquise par mutation chromosomique ou par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme. Les résistances bactériennes acquises par des gènes transférés sont les plus fréquentes, tandis que celle

Chapitre I : L'antibiorésistance

acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (Courvalin et *al.*, 2001).

Ces gènes de résistance codent pour rendre la bactérie insensible à l'antibiotique, par l'un des trois principaux mécanismes de résistance : l'inactivation enzymatique, l'accumulation intracellulaire réduite ou la modification des sites cibles cellulaires. Ils sont généralement associés à des éléments génétiques mobiles, notamment des plasmides, des transposons, des cassettes de gènes, des éléments intégratifs et conjugatifs ou d'autres éléments mobiles (Schwarz et *al.*, 2017).

I.3. Les bactéries multirésistantes

Les bactéries multirésistantes constituent un phénotype complexe, dont la principale caractéristique est la résistance à un large spectre d'agents antimicrobiens. Elles sont définies comme des bactéries résistantes à au moins un antibiotique dans trois classes différentes ou plus (Alemayehu, 2021). Ces types de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisent plusieurs mécanismes pour éviter l'impact nocif des antibiotiques tels que l'accumulation de multiples gènes de résistance au sein d'une seule cellule, l'expression excessive de gènes de pompe à efflux multidrogues qui pompent une gamme diversifiée de médicaments, et la sécrétion de plusieurs enzymes de dégradation (Bharadwaj et *al.*, 2022).

I.4. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

Les bactéries disposent, de façon innée ou par acquisition via transfert horizontal, de multiples gènes qui leur assurent une protection contre l'action des antibiotiques. Les stratégies de résistance les plus couramment observées se répartissent en quatre grandes catégories (Fig. 1):

- (1) Limiter l'absorption d'un médicament
- (2)) Modifier une cible médicamenteuse
- (3) Inactiver un médicament
- (4) Efflux actif du médicament après son entrée dans la cellule (Chancey et *al.*, 2012; Mahon et *al.*, 2014; Duval et Cossart, 2019).

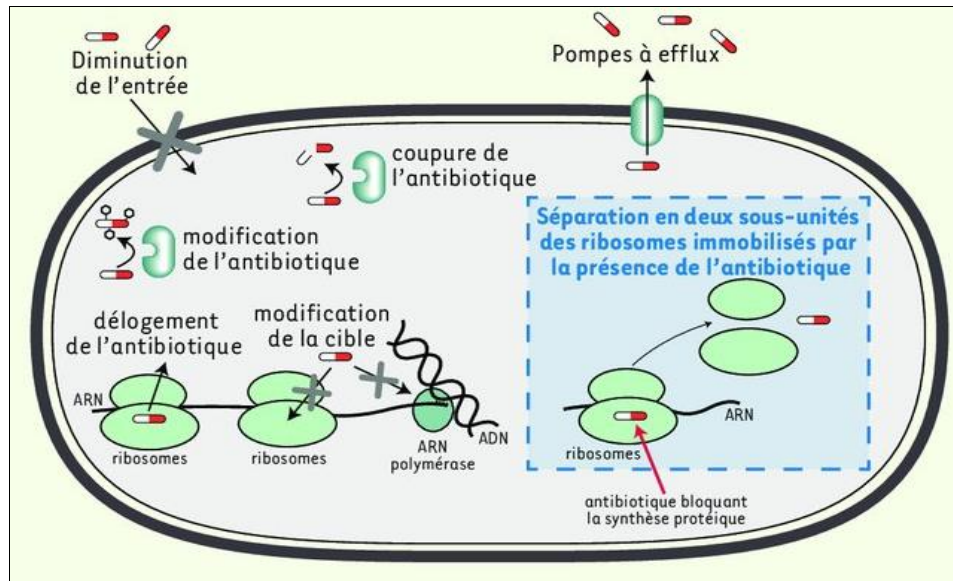


Figure 1 : Différents types de résistance aux antibiotiques (Duval et Cossart, 2019)

I.4.1. Limitation de l'absorption des médicaments

La structure et les fonctions de la couche de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif constituent une barrière contre certains types de molécules (Nikaido et *al.*, 2003 ;Chevalier et *al.*, 2017). Cette barrière empêche notamment la pénétration de nombreux agents antimicrobiens de grande taille, ce qui confère à ces bactéries une résistance innée à certains groupes de grands agents antimicrobiens (Blair et *al.*, 2014). L'inefficacité des antibiotiques glycopeptidiques, comme la vancomycine, contre les bactéries à Gram négatif en raison de leur absence de pénétration à travers la membrane externe illustre parfaitement l'efficacité de cette barrière naturelle (Blair et *al.*, 2015).

Les mycobactéries possèdent une membrane externe riche en lipides ; les médicaments hydrophobes comme la rifampicine et les fluoroquinolones ont donc un accès plus facile à la cellule, tandis que les médicaments hydrophiles ont un accès limité (Kumar et *al.*, 2003 ; Lambert et *al.*, 2022).

Chez les entérocoques, la difficulté des molécules polaires à traverser la paroi cellulaire confère une résistance intrinsèque aux aminoglycosides.

Par ailleurs, *S. aureus*, a développé deux mécanismes de résistance à la vancomycine. L'un d'eux reste encore inexpliqué permettant aux bactéries de produire une paroi cellulaire épaisse qui rend difficile l'entrée du médicament dans la cellule et fournit une résistance intermédiaire à cet antibiotique. Ces souches sont appelées Souches de *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine (Miller et *al.*, 2014; Lambert et *al.*, 2022).

I.4.2. Modification de la cible

L'altération de la structure et/ou du nombre de protéines de liaison à la pénicilline (PBP) constitue l'un des mécanismes de résistance aux médicaments à base de β -lactamines utilisés presque exclusivement par les bactéries à Gram positif. Les PBP sont des transpeptidases impliquées dans la construction du peptidoglycane dans la paroi cellulaire. Un changement dans le nombre de PBP (augmentation des PBP ayant une faible affinité pour l'antibiotique, ou d'une diminution des PBP avec une liaison normale au médicament) a un impact sur la quantité de médicament qui peut se lier à cette cible. Par ailleurs, une altération structurale des PBP peut également entraîner une résistance. Par exemple, chez *Staphylococcus aureus*, l'acquisition du gène *mecA* permet l'expression de la protéine PBP2a, dont l'affinité pour les β -lactamines est considérablement réduite, rendant leur action inefficace, voire totalement inhibée (Reygaert et al., 2009 ; Beceiro et al., 2013).

I.4.3. Inactivation des médicaments

Les bactéries peuvent inactiver les médicaments soit par la dégradation ou par le transfert d'un groupe chimique au médicament (Kumar et al., 2013 ; Blair et al., 2015). Les bactéries peuvent produire des enzymes capables de lier divers groupes chimiques aux médicaments. Cela empêche l'antibiotique de se lier à sa cible dans la cellule bactérienne (Lin et al., 2015). Les deux types d'inactivation utilisent le plus souvent le transfert de groupes acétyl, phosphoryl et adényl. De nombreuses enzymes transférases responsables de ces réactions ont été identifiées. Parmi elles, l'acétylation est le mécanisme le plus utilisé et est connue pour être utilisée contre les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptogramines et les fluoroquinolones. La phosphorylation et l'adénylation sont connues pour être utilisées principalement contre les aminoglycosides (Blair et al., 2015 ; Munita et al., 2016).

La structure centrale de la classe de médicaments les bêta-lactamines est une boucle -lactamine à quatre côtés, commune à tous les membres. L'activité des β -lactamases détruit la boucle β -lactamine, mécanisme clé de la résistance aux β -lactamines. Les β -lactamases hydrolysent la formation du cycle β -lactamine, inhibant ainsi sa liaison aux protéines de liaison à la pénicilline (Bush et al., 2016).

I.4.4. Le mécanisme d'efflux actif

Les pompes à efflux sont des protéines qui se trouvent sur les membranes bactériennes, elles contrôlent le flux de substances toxiques de l'environnement cellulaire interne vers

Chapitre I : L'antibiorésistance

l'environnement cellulaire externe. Elles sont présentes chez presque toutes les bactéries (AlMatar et al., 2021). Elles contribuent largement à la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif. Les pompes à efflux existent sous différentes formes et sont largement répandues parmi les espèces bactériennes (Reygaert ., 2018).

Les gènes codant pour ces pompes peuvent être portés par le chromosome. Certaines sont exprimées de manière constitutive, d'autres sont induites ou surexprimées sous certains stimuli environnementaux ou lorsque le substrat approprié est présent. Il existe six grandes familles de pompes à efflux chez les bactéries (Du et al., 2018) :

- ✓ la famille des cassettes de liaison à l'ATP (ABC).
- ✓ la famille des extrusions de composés toxiques et multidrogues (MATE).
- ✓ la famille des petites résistances aux médicaments multiples (SMR).
- ✓ la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS).
- ✓ la famille des résistances-nodulation-division cellulaire (RND) est présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif.
- ✓ la famille des efflux de complexes antimicrobiens protéobactériens (PACE).

I.5. Les antibiotiques et leur mécanisme d'action

Les antibiotiques se sont imposés depuis plusieurs décennies comme de véritables médicaments miracles dans le traitement des infections humaines et animales. La plupart des antibiotiques commerciaux provient naturellement de champignons ou des bactéries produits dans le cadre de leur répertoire de métabolites secondaires. Le cas le plus connu est la production de la pénicilline par le *Penicillium*, la streptomycine et la tétracycline qui sont issus de bactéries du sol appartenant au genre *Streptomyces* (Procópio et al., 2012).

Certaines études ont montré que, dans certaines circonstances, des bactéries peuvent inhiber la croissance de leurs voisines (Cornforth et Foster, 2015). Dans d'autres cas, il a été démontré que les antibiotiques influencent les réponses transcriptionnelles cellulaires et pourraient donc agir comme des molécules de signalisation, régulant les interactions et réponses au sein des communautés bactériennes (Goh et al., 2002 ; Linares et al., 2006). Plus récemment, il a été suggéré que les antibiotiques pourraient en réalité faire partie intégrante de la fonction physiologique de l'organisme producteur, en participant à la régulation du taux de croissance cellulaire (Esnault et al., 2017).

Chapitre I : L'antibiorésistance

L'activité antimicrobienne de la plupart des classes d'antibiotiques repose sur la cible d'un composant spécifique de la structure bactérienne ou d'un processus métabolique essentiel. Par conséquent, les chercheurs classent les antibiotiques selon leur mécanisme d'action et leur structure chimique (Garima et al., 2018 ; Kaur Sodhi et Singh, 2022), en décrivant jusqu'à présent quatre mécanismes d'action des antibiotiques (Fig. 2, Tab. 1).

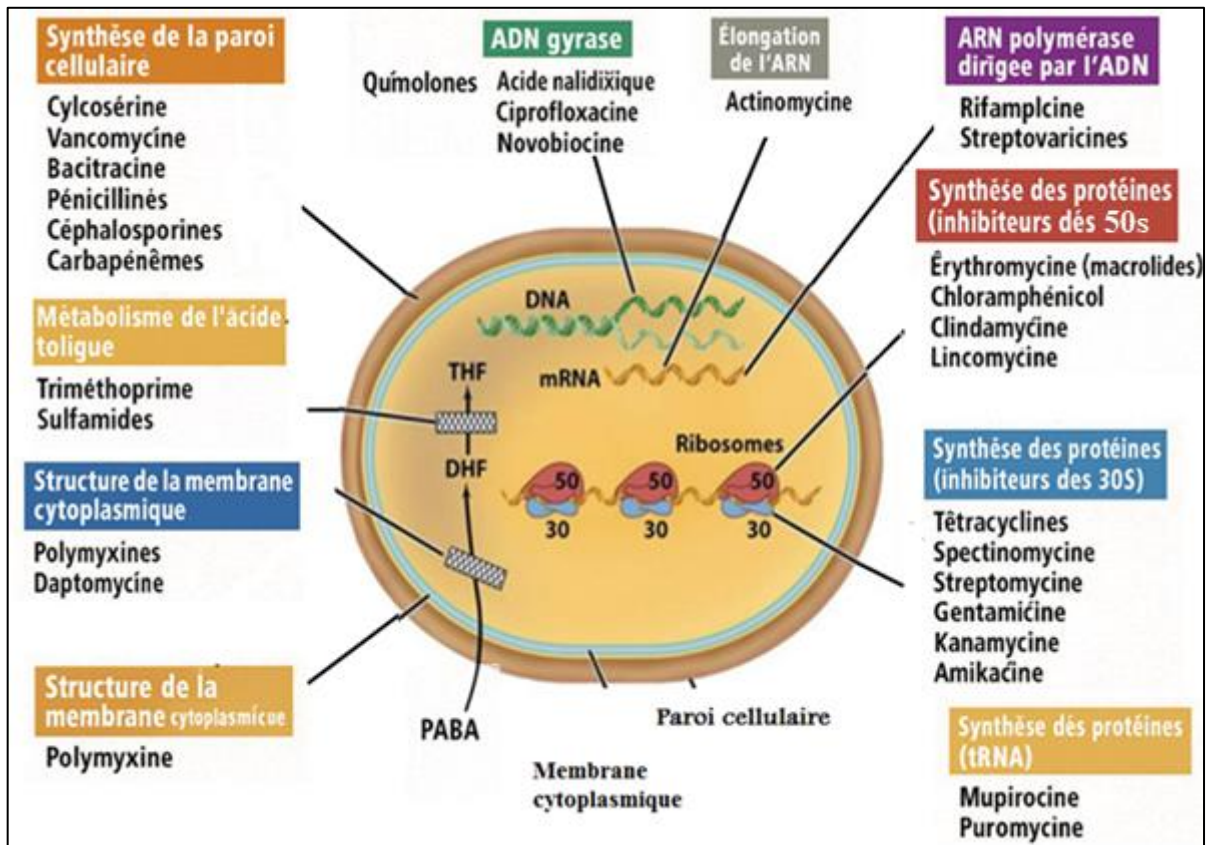


Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques (Uddin et al., 2021).

I.5.1. Inhibition de la réplication de l'ADN

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, et une bonne diffusibilité dans les tissus.

L'ADN gyrase, également appelée topoisomérase II, est une enzyme bactérienne essentielle composée de sous-unités 2A et 2B. La sous-unité A est responsable du clivage et du ressoudage des brins d'ADN, tandis que la sous-unité B introduit de supers enroulements négatifs. Cette enzyme joue un rôle fondamental non seulement dans la réplication de l'ADN, mais également dans la transcription de nombreux gènes. Elle permet notamment d'éliminer les tensions

Chapitre I : L'antibiorésistance

superhélicoïdales positives générées en amont de la fourche de réplication (Bush et *al.*, 2015 ; Nagaraja et *al.*, 2017).

Les fluoroquinolones se lient à la sous-unité A avec une forte affinité et interfèrent avec sa fonction de coupure et de rescellement des brins. Chez les bactéries à Gram positif, la cible principale de l'action est la topoisomérase IV, qui coupe et sépare son propre brin après la réplication de l'ADN. La plus grande affinité de cette enzyme pourrait conférer une plus grande efficacité contre les bactéries à Gram positif. Au lieu de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, les cellules de mammifères possèdent la topoisomérase II, qui a une très faible affinité pour la FQ et donc une faible cytotoxicité (Wise. 1999; Higgins et *al.*, 2003; Yoneyama et Katsumata., 2006) (Fig. 3).

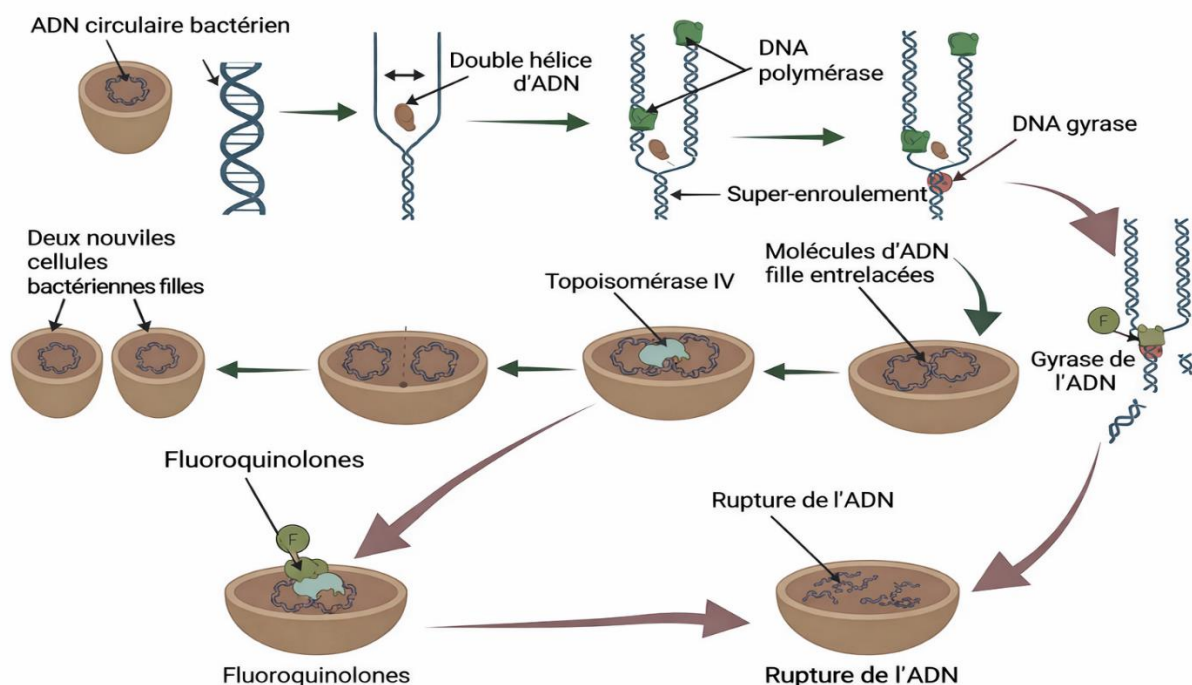


Figure 3: Mécanisme d'action moléculaire des antibiotiques inhibant la réplication de l'ADN (Sivaraj et al., 2025)

I.5.2. Inhibition de la biosynthèse des protéines

Les bactéries possèdent de l'ADN, qui contient l'information génétique de chaque protéine nécessaire à leur survie (Wu, 2009). Les informations contenues dans l'ADN bactérien sont utilisées pour synthétiser une molécule d'ARN appelée ARN messager (ARNm), un processus connu sous le nom de transcription. Ensuite, la structure macromoléculaire appelée ribosome synthétise les protéines présentes dans l'ARNm, un processus appelé traduction. La biosynthèse

Chapitre I : L'antibiorésistance

des protéines est catalysée par les ribosomes et les facteurs cytoplasmiques. Ces organites comportent une petite sous-unité (qui se charge de lire l'information portée par l'ARN messager) et d'une grande sous-unité qui se charge d'intégrer les acides aminés). Le ribosome 70S bactérien est composé de deux sous-unités ribonucléoprotéiques, les sous-unités 30S et 50S (Yoneyama et Katsumata., 2006). Par conséquent, le ciblage des sous-unités ribosomiques 30 ou 50 est nécessaire pour que les antibiotiques interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse (Scott Champney, 2008).

I.5.2.1. Inhibiteurs de la sous-unité 30S

- Les aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques chargés positivement, qui agissent via un mécanisme spécifique ciblant le ribosome bactérien. Ces molécules se lient à la membrane externe, chargée négativement, des bactéries, formant de larges pores qui leur permettent de pénétrer dans la cellule. De plus, les aminosides peuvent traverser la membrane cytoplasmique bactérienne grâce à l'énergie fournie par le transport actif, un processus nécessitant la présence d'oxygène. Par conséquent, leur efficacité contre les bactéries anaérobies est faible.

La cible principale des aminosides est l'ARN 16S de la sous-unité 30S du ribosome, auquel ils se lient par des liaisons hydrogène, provoquant des erreurs de traduction de l'ARNm et une inhibition de la synthèse protéique. Ces antibiotiques présentent également un effet synergique lorsqu'ils sont associés à des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui augmente leur capacité à pénétrer la cellule à faibles doses (Kapoor et *al.*, 2017).

- La tétracycline

Les tétracyclines, telles que la tétracycline, la chlortétracycline, la doxycycline ou la minocycline, agissent en empêchant la liaison de l'ARNt au site A du ribosome, ce qui entrave la synthèse protéique (Brodersen et *al.*, 2000 ; Yoneyama et Katsumata ., 2006).

I.5.2.2. Inhibiteurs de la sous-unité 50s

- Les macrolides

Les macrolides inhibent la synthèse des polypeptides et la production de protéines en se liant à la sous-unité 50S du ribosome, ce qui entraîne une dissociation prématurée des chaînes polypeptidiques incomplètes (Tenson et *al.* , 2003)

-Les chloramphénicol

Les antibiotiques de la famille des chloramphénicol inhibent la peptidyl transférase, une enzyme située sur la sous-unité ribosomique 50S et nécessaire à la synthèse protéique. Cette inhibition empêche l'ARNt de se lier au site A du ribosome, ce qui inhibe la synthèse protéique (Syroegin et *al.*, 2022)

- Les oxazolidinones

Les oxazolidinones interfèrent avec la synthèse protéique en se liant à l'ARN 23Sr de la sous-unité 50S. Elles inhibent la formation du complexe d'initiation 70S et interagissent avec le peptidyl-ARNt, ce qui bloque la traduction (Kapoor et *al.*, 2017; Foti et *al.*, 2021).

I.5.3. Antibiotiques ciblant la structure de la membrane cellulaire

Certains antibiotiques exercent une activité bactéricide en ciblant spécifiquement la structure de la membrane plasmique des bactéries. Il s'agit principalement d'antibiotiques polypeptidiques dont l'usage thérapeutique demeure restreint en raison de leur toxicité. Ces molécules naturelles, produites par des bactéries du genre *Bacillus*, se classent en deux sous-familles principales (Moroh, 2013):

I.5.3.1. Les polypeptides tensio-actifs :

Ce groupe est représenté par les polymyxines (ou colistines), des antibiotiques cycliques isolés de *Bacillus polymyxa*. On distingue plusieurs types (A, B, C, D, E, F, K, M, P, S et T), mais seules les polymyxines B et E sont exploitées en thérapeutique. Grâce à leur caractère amphiphile, ces molécules s'insèrent entre les phospholipides membranaires, altèrent la perméabilité de la membrane bactérienne et provoquent la lyse et la mort cellulaire, agissant ainsi comme de véritables détergents biologiques (Moroh, 2013).

I.5.3.2. Les polypeptides non tensio-actifs :

Ce groupe comprend notamment la tyrocidine, la bacitracine et la gramicidine. La gramicidine est un antibiotique qui correspond à un mélange de trois variantes : la gramicidine A ($\approx 80\%$), la gramicidine B ($\approx 6\%$) et la gramicidine C ($\approx 14\%$), produites par *Bacillus brevis*. En s'insérant dans la membrane plasmique, la gramicidine forme des canaux ioniques qui augmentent la perméabilité membranaire, ce qui conduit à la mort cellulaire (Bourinbaïar et Coleman, 1997).

I.5.4. Antibiotiques ciblant la paroi cellulaire

Les cellules bactériennes sont entourées d'une paroi rigide composée de peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Ce peptidoglycane est réticulé grâce à l'action des transglycosidases qui assurent l'assemblage des brins de glycane. Parallèlement, des chaînes peptidiques, attachées aux sucres, forment des liaisons croisées entre elles (Kahne *et al.*, 2005). La portion D-alanyl-alanine de la chaîne peptidique est réticulée par des résidus de glycine en présence de protéines de liaison à la pénicilline (PBP), cette réticulation renforce la paroi cellulaire (Liu et Breukink, 2016).

Les pénicillines et les céphalosporines, appartiennent aux groupes des bêta lactamines, ils contiennent le cycle β -lactame dans leur structure (Fernandes *et al.*, 2013). Cette structure leur permet de se fixer sur les enzymes bactériennes responsables de la synthèse de la paroi cellulaire, telle que la transpeptidase et la carboxypeptidase. Cette inhibition interrompt la synthèse de la paroi cellulaire et entraîne la lyse et la mort des cellules bactériennes (Cho *et al.*, 2014)(Figure 4).

Les glycopeptides inhibent la synthèse du peptidoglycane ou muréine formé de molécules de N-acétyl-D glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique, par la formation d'une liaison non covalente avec les glucides terminaux. Ce mécanisme conduit à la dégradation des parois bactériennes, entraînant la destruction et l'élimination des cellules bactériennes (Bégué et Astruc, 1999 ; Kang et Park, 2015) (Fig. 4).

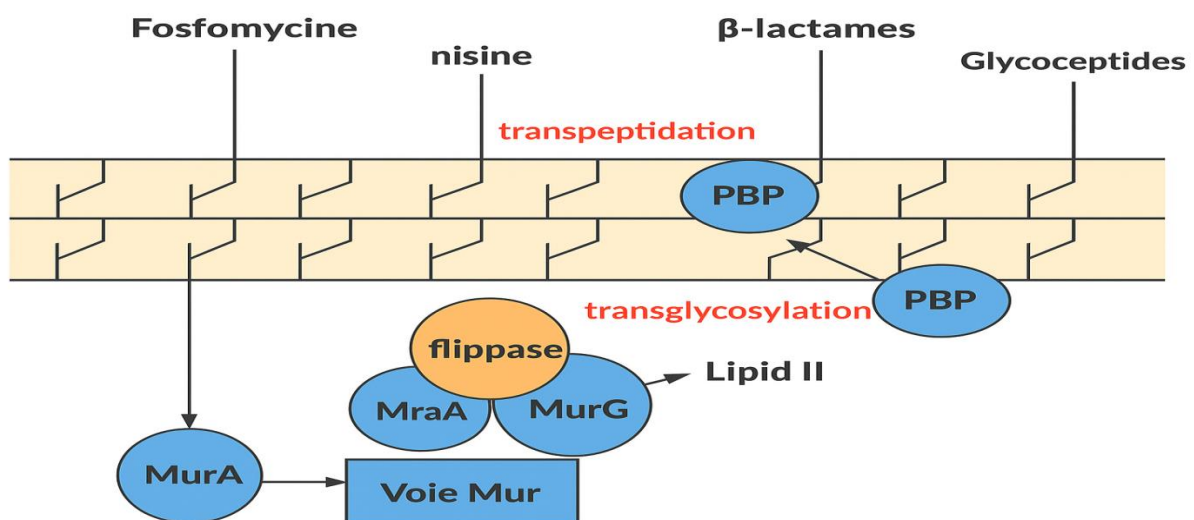


Figure 4: Antibiotiques ciblant la paroi cellulaire (Godzaridis, 2012)

I.5.5. Inhibition du métabolisme de l'acide folique

L'acide folique appartient à la famille des vitamines B, un groupe de petites molécules hydrosolubles, qui agissent comme cofacteurs enzymatiques pour réaliser diverses fonctions métaboliques (Zheng et *al.*, 2018).

Le métabolisme de l'acide folique est essentiel au bon fonctionnement de toutes les cellules vivantes (Lucock et *al.*, 2000 ; Fernández-Villa et *al.*, 2018). Le folate participe à de nombreuses réactions, liées à de nombreuses voies de biosynthèse permettant la synthèse correcte des protéines et des acides nucléiques dans différents organismes. D'une part, il participe aux réactions de synthèse de certains acides aminés tels que la méthionine, la sérine, la glycine, l'histidine ou le glutamate, ainsi qu'à la formylation des ARN de transfert, étapes essentielles à la synthèse des protéines. D'autre part, il est également impliqué dans la synthèse des bases azotées puriques et pyrimidiques et régule épigénétiquement l'expression des gènes via les réactions de transfert d'un seul carbone mentionnées précédemment (Fowler et *al.*, 2001 ; Zheng et *al.*, 2018).

Les sulfamides appartiennent au groupe des antifolates non classiques et inhibent la DHPS en pénétrant dans la poche PABA de l'enzyme, empêchant ainsi l'entrée du l'acide p-aminobenzoïque PABA dans le site réactionnel et en formant un analogue inutilisable comme sous-produit dans la réaction suivante du cycle du folate (Scocchera et *al.*, 2017). Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs de cette enzyme et ils provoquent une réduction drastique des taux de folate. Comme les bactéries ne peuvent internaliser le folate exogène, cette réduction entraîne des erreurs dans la synthèse de l'ADN en raison de la déplétion en thymine, un mécanisme de mort cellulaire défini comme « mort sans thymine » (Goulian et *al.*, 1986) .

Chapitre I : L'antibiorésistance

Tableau 1 : Mécanisme d'action, spectre d'activité, mécanisme, taux de résistance et indication des principale classes thérapeutiques (Le Minor et Véron, 1989, Bégué et Astruc,1999, Decousser *et al.*,2025)

Mode d'action	Famille / Sous-famille	Exemple	Spectre d'activité	Mécanismes de résistance	Fréquence des résistances	Indications
Inhibition de la transpeptidase (β-lactamines)	Pénicillines G	Pénicilline G	Gram +	β-lactamases, mutations PBP	Variable	Infections streptocoques, syphilis
	Pénicillines M	Oxacilline	Gram + (anti-staphylocoque)	PBP modifiées (MRSA)	Fréquente chez SARM	Infections à staphylocoques sensibles
	Pénicillines A	Amoxicilline	Gram + et Gram –	β-lactamases	Élevée (entérobactéries)	ORL, urinaires, digestives
	Carboxy/uréido/amidopénicillines	Ticarcilline, Pipéracilline	Gram + et –, y compris <i>Pseudomonas</i>	β-lactamases, efflux	Élevée	Infections sévères à Gram –
	Carbapénèmes	Imipénème	Très large spectre, Gram +, Gram –, anaérobies, entérocoques, <i>Pseudomonas</i>	Carbapénèmases	Rare mais grave	Infections graves multirésistantes
Inhibition transpeptidase (céphalosporines)	1ère génération	Céfalexine	Gram + et – (spectre limité)	β-lactamases	Variable	Infections urinaires, cutanées
	2ème génération	Céfuroxime	Gram + et –	β-lactamases	Variable	Infections respiratoires
	3ème génération	Ceftazidime	Gram + et –, couvre <i>Pseudomonas</i>	Céphalosporinas es, efflux	En augmentation	Infections graves Gram –

Chapitre I : L'antibiorésistance

Inhibiteurs polymérisation peptidoglycane	Glycopeptides	Vancomycine	Gram +	Gènes modifiant la cible (vanA)	Rare	Infections graves à Gram + résistants (SARM, entérocoques)
Inhibiteurs formation acide N-acétyl-muramique	Fosfomycine	Fosfomycine	Gram + et -	Mutations transport/cible, enzymes inactivatrices	<2% <i>E. coli</i>	Cystites simples, BMR
Inducteurs d'erreurs de décodage (30S)	Aminosides	Amikacine, Netilmicine	Gram + (sauf streptocoques) et Gram - ; synergie avec β -lactamines/glycopeptides	Enzymes inactivatrices, efflux	<2% <i>E. coli</i> , <5% <i>P. aeruginosa</i>	Infections sévères (association), IU BMR
Inhibition élongation site P (50S)	Macrolides	Erythromycine	Gram + et -, sauf <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , intracellulaires	Mutations, efflux, gènes de protection cible	25% <i>S. aureus</i> , pneumocoque	1ère intention intracellulaires, 2e intention staphylocoques/streptocoques
	Lincosamides	Lincomycine	Gram + et -, sauf <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Mutations, efflux	Variable	Infections cutanées, osseuses
	Synergistines	Dalfopristine	Gram + (multirésistants)	Mutations ribosomiques	Rare	Recours Gram + résistants
Inhibition peptidyl-transférase (50S)	Phénicoles	Chloramphénicol	Gram + et -, y compris <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Salmonella</i>	Acétyltransférases, efflux	Rare	Recours infections graves (méningite, typhoïde)
Inhibition fixation ARNt (30S)	Cyclines	Tétracycline, Doxycycline	Gram + et -, intracellulaires (<i>Chlamydia</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Rickettsia</i>)	Mutations, efflux, protection cible	<10% <i>S. aureus</i>	2e intention infections intracellulaires

Chapitre I : L'antibiorésistance

Inhibition gyrase et topoisomérase IV	Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	Gram + et –, y compris <i>Pseudomonas</i>	Mutations gyrA/parC, efflux	>20% <i>E. coli</i>	Recours si pas d'alternative
Action sur membrane externe	Polymyxines	Colistine	Gram – multirésistants (<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>)	Modification du LPS	Pas endémique	Dernier recours infections Gram –
Inhibition transcription (ARN polymérase)	Rifamycines	Rifampicine	<i>S. aureus</i> , <i>M. tuberculosis</i>	Mutations	<1% <i>S. aureus</i> , 1% <i>M. tuberculosis</i>	Jamais seule (association tuberculose, staphylocoques)
Action ADN (cassures, radicaux libres)	Nitro-5-imidazolés	Métronidazole	Anaérobies, protozoaires digestifs	Rare	<5% <i>B. fragilis</i>	1ère intention infections anaérobies, parasitoses digestives
Action enzymatique multiple	Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	<i>E. coli</i> , staphylocoques	Mutations chromosomiques	<1%	1ère intention cystites simples
Inhibition synthèse protéique	Acide fusidique	Acide fusidique	Staphylocoques	Mutations	<2% <i>S. aureus</i>	Recours infections cutanées staphylococciques
	Mupirocine	Mupirocine	Staphylocoques	Mutations	Peu de données	Décolonisation nasale <i>S. aureus</i>

Chapitre II:

Staphylococcus aureus

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

II.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif, aéro-anaérobie facultative qui agit à la fois comme organisme commensal et comme pathogène opportuniste responsable de nombreuses maladies infectieuses humaines (Getaneh et al., 2021). Elle est responsable d'un large éventail de pathologies mortelles telles que l'endocardite, l'ostéomyélite, la pneumonie, la septicémie, la méningite, l'arthrite septique, le syndrome du choc toxique et l'intoxication alimentaire et d'autres maladies invasives (Saedi et al., 2020 ; Tuon et al., 2023).

La pathogénicité de *S. aureus* est principalement attribué à ses nombreux facteurs de virulence sécrétés, qui lui permettent d'adhérer aux tissus de l'hôte, d'échapper aux réponses immunitaires et d'endommager les cellules hôtes en développant des biofilms, ce qui contribue fortement à sa résistance aux médicaments (Chen et al., 2022).

II.2. Taxonomie

Selon la taxonomie actuelle, *S. aureus* est classée comme suit : (Gajdacs, 2020).

Règne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

II.3. Origines et établissement de l'infection

Les infections à *S. aureus* proviennent généralement d'une colonisation asymptomatique ou, probablement plus rarement et surtout en milieu hospitalier, de vecteurs passifs infectés ou d'un transfert d'autres personnes (Von Eiff et al., 2001; Desai et al., 2011).

S. aureus peut coloniser de nombreuses zones cutanées principalement l'épithélium nasal. La muqueuse nasale est traditionnellement considérée comme le principal site de colonisation de *S. aureus*, grâce à l'acide téichoïque et aux composants de surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice adhésive (CHiB) (Tab. 2). Deuxièmement, La gorge

Chapite II : Staphylococcus aureus

et l'oropharynx, entraînant une perturbation de la barrière et un risque d'infection. Ensuite, La peau : la bactérie interagit avec l'épiderme en utilisant des adhésines telles que SasG et ClfB pour se lier aux composants cutanés et induire une inflammation. Ainsi que l'épithélium intestinal, en produisant des toxines et des protéines associées au mucus qui facilitent leur colonisation, les aisselles et le vagin (Fig. 5) (Williams et *al.*, 1963 ; Guinan., 1982; Touaitia et *al.*, 2025).

Tableau 2 : Taux de portage nasal de MRSA et MSSA selon les pays et les groupes de population étudiés (Touaitia et *al.*, 2025)

Pays	Population étudiée	Taux de portage de MSSA	Taux de portage de MRSA
Angletaire	Patients externes en orthopédie	22.4–35.6%	1.2–4.3%
USA	Patients subissant une fixation de fracture	20.18%	4.70%
USA	Patients pédiatriques en état critique	Not specified	6.5%
Ethiopie	Agents d'entretien hospitaliers	22.2%	8.1%
Ethiopie	Agents d'entretien non hospitaliers	14.4%	1.4%
Argentine	Professionnels de santé	23.7%	6.3%
France	Donneurs de sang en bonne santé	29.3%	0.3%
France	Patients hospitalisés	20.2%	1.1%
Sierra Leone	Population générale	42.7%	14%
Leban	Population générale	38.4%	1.6%
Chine	Étudiants en médecine	15.4–23.1%	3.0–9.4%
Arabie Saudi	Professionnels de santé	40%	18%
Algerie	Animaux d'élevage et humains en contact	50% (Humans)	7.6% (Livestock)
Portugal	Personnes sans-abri (Lisbonne)	50%	1.2%

S. aureus peut également exploiter de manière opportuniste les dommages primaires causés par d'autres agents pathogènes ou des conditions prédisposantes. Cela se produit, par exemple, lors d'infections pulmonaires initiées par une infection virale comme la grippe, où

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

une infection secondaire à *S. aureus* est souvent la cause ultime du décès (Morens et *al.*, 2008; McCullers, 2014). De plus, il a été démontré que *S. aureus* contribue au développement de la dermatite atopique par l'intermédiaire de toxines spécifiques, notamment la δ -toxine ou des peptides cytolitiques similaires appelés modulines phénol-solubles (PSM), en activant les mastocytes (Hodille et *al.*, 2016; Liu et *al.*, 2017). De plus, *S. aureus* peut compliquer les infections cutanées causées par d'autres agents pathogènes. Par exemple, l'exacerbation des ulcères de Buruli, même après l'éradication de l'agent pathogène initial (*Mycobacterium ulcerans* dans ce cas) par un traitement antibiotique (Yeboah et *al.*, 2013). *S. aureus* a la capacité d'adhérer au matériau plastique des dispositifs ainsi qu'aux molécules de la matrice qui les recouvrent peu après leur insertion, et à former un biofilm sur le dispositif (Huang et *al.*, 2022).

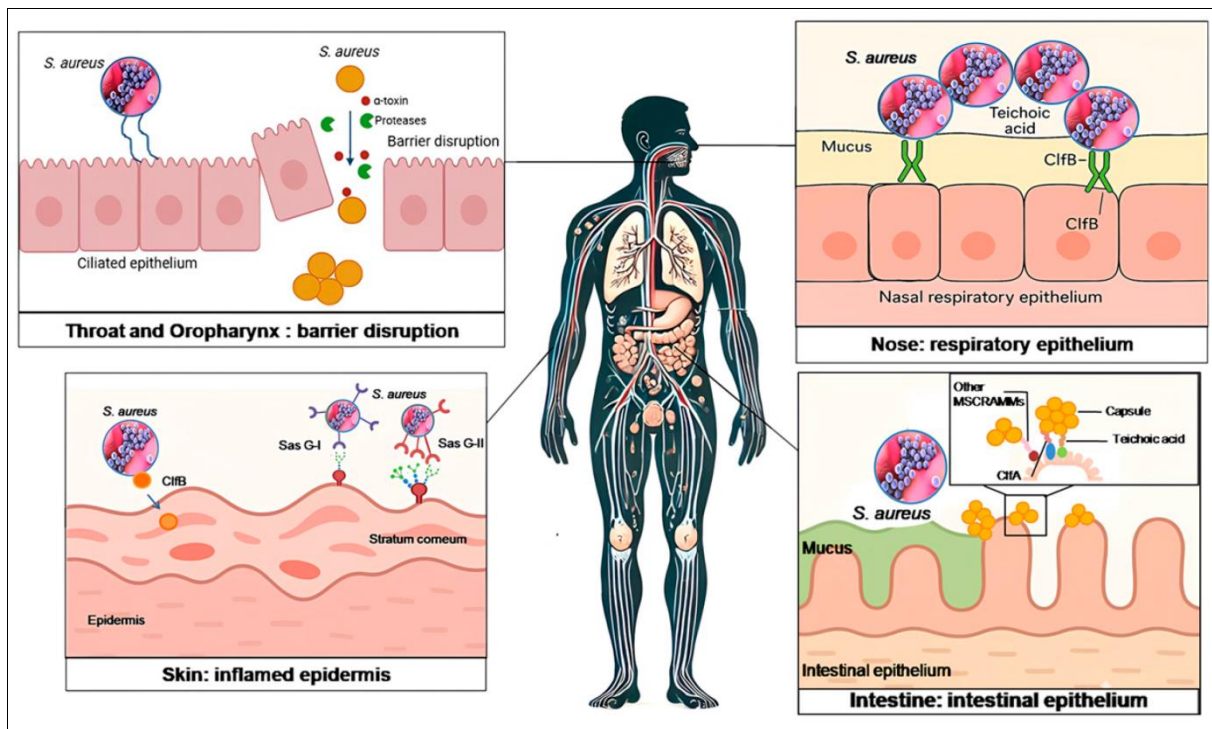


Figure 5: Interaction entre *S. aureus* et l'épithélium de l'hôte: mécanismes de colonisation et de perturbation de la barrière (Touaitia et *al.*, 2025).

Chapite II : Staphylococcus aureus

II.4. Mécanisme du quorum sensing chez *S. aureus* :

Le quorum sensing (QS) est un système de communication entre les bactéries, qui implique la production, la détection et la réponse à des molécules de signalisation extracellulaires appelées auto-inducteurs (AI). Il implique de multiples voies de transduction du signal qui régulent la formation du biofilm, la virulence, la motilité et la sporulation (Peng et al., 2022).

Chez *Staphylococcus aureus*, de nombreux facteurs de virulence sont régulés par le quorum sensing (QS) médié par le Agr (Mahdally et al., 2021). Un régulateur de gène accessoire (agr) dans le système de détection de quorum (QS) chez *S. aureus* contribue à l'infection de l'hôte, à la production de facteurs de virulence. De plus, le QS augmente également la résistance de *S. aureus* au stress oxydatif dans l'environnement externe (Howden et al., 2023; Podkowik et al., 2023).

Le système agr de *S. aureus* repose sur un peptide auto-inducteur (AIP) qui s'accumule dans l'environnement extracellulaire. Lorsqu'une concentration critique est atteinte, correspondant à un quorum cellulaire, le système s'active. Il comporte deux transcrits principaux, activés respectivement par les promoteurs P2 et P3 (Reyes et al., 2011) : ARN II, un opéron (agrBDCA) codant la machinerie de quorum sensing (Gordon et al., 2016), et ARN III, un effecteur majeur régulant les gènes cibles dépendants de agr (Peng et al., 1988). L'AIP est synthétisé à partir d'AgrD (Ji et al., 1995), traité par la peptidase membranaire AgrB (Bardelang et al., 2023), et libéré sous forme mature dans le milieu extracellulaire via SspB (Kavanaugh et al., 2007). L'AIP accumulé se lie ensuite à l'histidine kinase AgrC et l'active, ce qui conduit à l'autophosphorylation et active AgrA (Wang et Muir, 2016). Ce dernier induit l'expression de RNAII et RNAIII via une boucle de rétroaction positive (Koenig et al., 2004), permettant la production d'exoprotéines tout en ralentissant la croissance bactérienne (Fig. 6) (Novick et al., 1995).

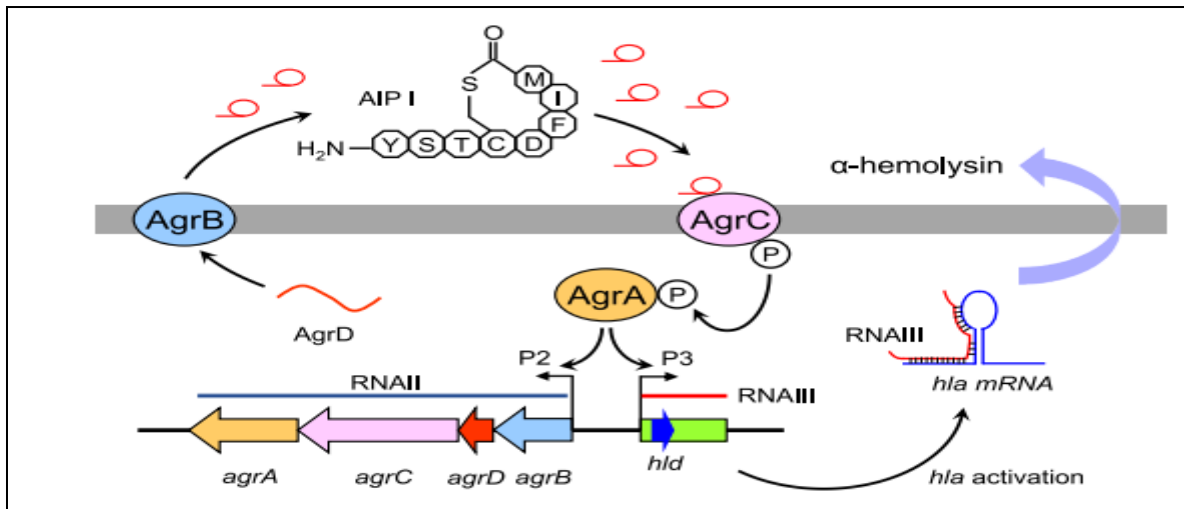


Figure 6 : le système de Quorum sensing chez *S. aureus* (Inagaki et al., 2024).

II.5. Les facteurs de virulence de *S. aureus*

S. aureus a deux types de facteurs de virulence, le premier type est associé à l'invasion et à l'inflammation qui impliquent la colonisation et la production de molécules extracellulaires favorisant l'adhésion et l'évasion des mécanismes de défense de l'hôte. Le deuxième type comprend les facteurs de virulence sous forme de toxines, libérées de manière extracellulaire pour endommager les tissus de l'hôte et favoriser la dissémination bactérienne et la formation de biofilm, essentielles à certaines infections (Zhu. 2010).

II.5.1. Protéines de surface (adhésines)

S. aureus exprime diverses protéines adhésines ancrées à sa couche de peptidoglycane, jouant un rôle clé dans l'adhésion et la colonisation. Ces protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA) sont classées en quatre groupes selon leurs motifs structuraux (Foster et al., 2014) :

II.5.1.1. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) : Comprend les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPA/B), les facteurs d'agglutination (ClfA/B), les protéines de liaison au collagène et les protéines Sdr (SdrC/D/E). Elles facilitent l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte comme le collagène, le fibrinogène et la fibronectine, et contribuent à l'invasion, à l'évasion immunitaire et à la formation de biofilms (George et al., 2006 ; Foster et al., 2014).

Le gène *Cna*, qui code pour l'adhésine collagène n'est pas présent dans toutes les souches de *S. aureus* (Alorabi et al., 2023). La région A du gène *Cna* est entièrement responsable de son activité de liaison au collagène, ce qui constitue en fait un facteur clé de la

Chapite II : Staphylococcus aureus

capacité du pathogène à adhérer aux tissus de l'hôte et à les envahir (Paharik et Horswill, 2016). La présence de *Cna* renforce la pathogénicité de *S. aureus* en lui permettant de s'ancrer dans les tissus de l'hôte, de résister à la phagocytose et de former des biofilms (Cheung et al., 2021).

Les protéines A (ClfA) et B (ClfB) du facteur d'agglutination facilitent l'adhésion du pathogène aux tissus de l'hôte en se liant à la protéine du plasma sanguin, le fibrinogène (Fg), la ClfA ciblant la chaîne γ et la ClfB la chaîne α (Herman-Bausier et al., 2018). Cette liaison différentielle renforce la capacité de *S. aureus* à former des agglutinations, à résister à la clairance immunitaire et à établir des infections. ClfA, en particulier, joue un rôle crucial dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*, contribuant à la capacité de l'agent pathogène à provoquer de graves infections sanguines (Tong et al., 2015).

La plupart des souches de *S. aureus* produisent deux protéines de liaison à la fibronectine similaires, FnBPA et FnBPB, codées par des gènes étroitement liés (Roche et al., 2004). Chez les souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM), les FnBP jouent un rôle clé dans la formation du biofilm, renforçant la capacité de la bactérie à persister dans l'hôte et à résister au traitement antibiotique (Piechota et al., 2018).

Les protéines Sdr (issues de la répétition SD) se lient principalement aux glycoprotéines osseuses et au fibrinogène, favorisant l'adhésion de *S. aureus* aux tissus hôtes (Paharik et Horswill, 2016). Le locus Sdr de *S. aureus* code trois protéines : SdrC, SdrD et SdrE. Alors que SdrC est constamment présente, SdrD et SdrE sont présentes de manière variable, SdrE se liant à des souches plus invasives (Ajayi et al., 2018). Sdr protège les bactéries des réponses immunitaires et des antibiotiques et joue un rôle essentiel dans les infections osseuses et vasculaires (Wu et al., 2024).

II.5.1.2. Protéines à motif NEAT : Les protéines Isd régulées par le fer (IsdA, IsdB, IsdH) se lient à l'hème ou à l'hémoglobine. L'IsdA réduit également l'hydrophobicité de surface et augmente la résistance aux peptides antimicrobiens et aux lipides bactériens (Clarke et al., 2008 ;Clarke et al.,2009).

II.5.1.3. Famille de faisceaux à trois hélices : Comprend la protéine A, spécifique à *S. aureus*, qui se lie à la région Fc des immunoglobulines, interfère avec l'opsonisation et induit des réponses inflammatoires de type TNF- α via l'activation de TNFR1 (Gómez et al.,2004).

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

II.5.1.4. Famille de répétitions G5-E : Comprend la protéine de surface G, impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales desquamées et dans le développement du biofilm (Geoghegan et *al.*, 2010).

II.5. 2. Les toxines

La compétence de *S. aureus* en tant qu'agent pathogène peut être attribuée à son arsenal de facteurs de virulence parmi lesquels les toxines sécrétées jouent un rôle important. Les toxines sont capables d'endommager les membranes cellulaires de l'hôte, soit en dégradant les connexions intercellulaires, soit en modulant les réponses immunitaires (Oliveira et *al.*, 2018).

Les principales toxines de *S. aureus* peuvent être divisées en trois groupes principaux (Grumann et *al.*, 2014) : les toxines porogènes (PFT), les toxines exfoliatives (ET) et les super antigènes (SAg).

II.5.2.1. Les toxines porogènes (PFT)

Les PFT sont un type de facteur de virulence bactérienne présent dans un large éventail de maladies humaines, notamment *S. aureus*, qui utilise une variété de cytotoxines formant des pores (c'est-à-dire des hémolysines, des leucotoxines et des modulines solubles dans le phénol) pour créer des pores dans la membrane de la cellule hôte provoquant la lyse cellulaire ou pour perturber le cytosquelette d'actine de la cellule hôte créant des brèches dans les cellules endothéliales (Ahmad-Mansour et *al.*, 2021).

S. aureus code les α -, β -, γ - et δ -hémolysines, qui sont régulées par le régulateur du gène accessoire (Agr) et, principalement, lysent les érythrocytes en créant des pores dans les membranes des cellules hôtes ou en dissolvant les composants de la paroi cellulaire (Divyakolu et *al.*, 2019). Le facteur de virulence le mieux étudié de *S. aureus* est l' α -hémolysine, codée par le gène *hla*, qui endommage une grande variété de cellules hôtes, telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les érythrocytes, les monocytes et les kératinocytes, ainsi que les membranes cellulaires et l'apoptose (Ahmad-Mansour et *al.*, 2021). La grande majorité des souches de *S. aureus* (95 %) possèdent le gène *hla*, indépendamment de leur résistance à la méthicilline. Le rôle de la toxine α -hémolysine dans le développement d'infections graves, telles que la pneumonie, l'ostéomyélite et la bactériémie, a été établi dans des études utilisant différents modèles expérimentaux infectés par la souche *S. aureus* USA300 (Wardenburg et *al.*, 2008 ; Crémieux et *al.*, 2014).

Les propriétés létales de l' α -toxine sont probablement dues à son effet sur les cellules impliquées dans le maintien de l'homéostasie. La formation des pores est un processus en

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

plusieurs étapes ; qui comprend la sécrétion de monomères d' α -hémolysine, qui se lient aux membranes cibles, s'oligomérisent pour former un complexe de pores heptamérique fonctionnel, le pré-pore. Les cellules sensibles ont des récepteurs spécifiques qui permettent à l' α -toxine de se lier, provoquant de petits pores de 14 Å entraînant la fuite de petits contenus cytoplasmiques inférieurs à 2 kDa, comme Ca^{2+} , K^{+} , modifiant les gradients ioniques et provoquant finalement la mort de la cellule (Bhakdil et Trandum-Jensen, 1991) (Fig. 07).

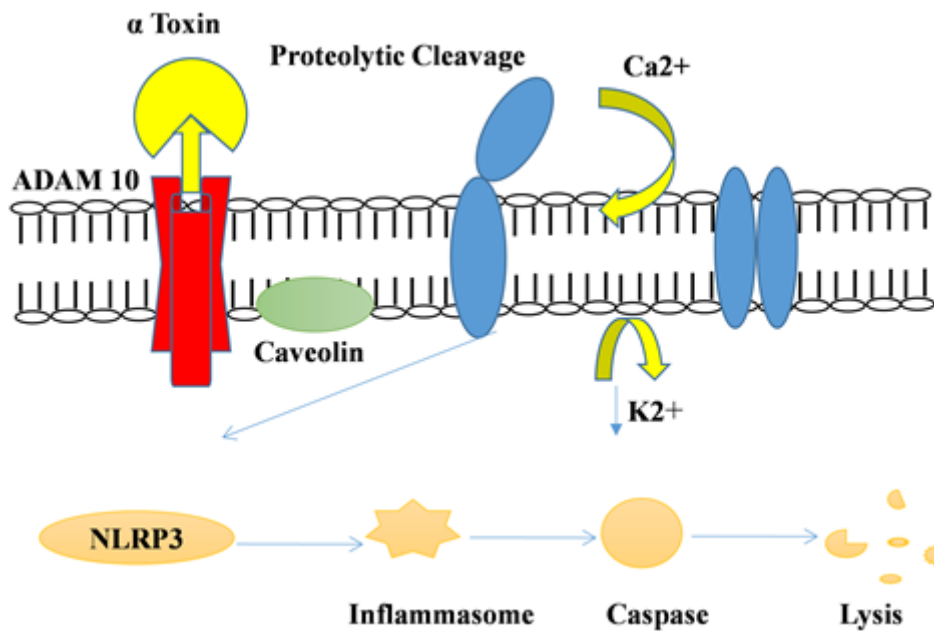


Figure 7 : Mécanisme d'action de l' α -hémolysine : 1) L' α -toxine se lie au récepteur de la membrane cellulaire ADAM10. 2) Augmentation du Ca^{2+} et chute rapide du K^{+} . 3) Activation de l'inflammasome NLRP3. 4) Activation de la caspase-1 qui conduit à la lyse cellulaire (Divyakolu et al., 2019).

II.5.2.2. Toxines exfoliatives (TE)

Les toxines exfoliatives (ET), également appelées toxines épidermolytiques, sont des protéases à sérine extrêmement spécifiques sécrétées par *S. aureus*. Ces protéases reconnaissent et hydrolysent les cadhérines desmosomes dans les couches superficielles de la peau (Bukowski et al., 2010). Les ET sont des exotoxines associées au clivage des jonctions des kératinocytes et à l'adhésion cellulaire dans l'épiderme de l'hôte, ce qui peut induire une desquamation de la peau et la formation de cloques (Fig. 8) (Nishifuji et al., 2008).

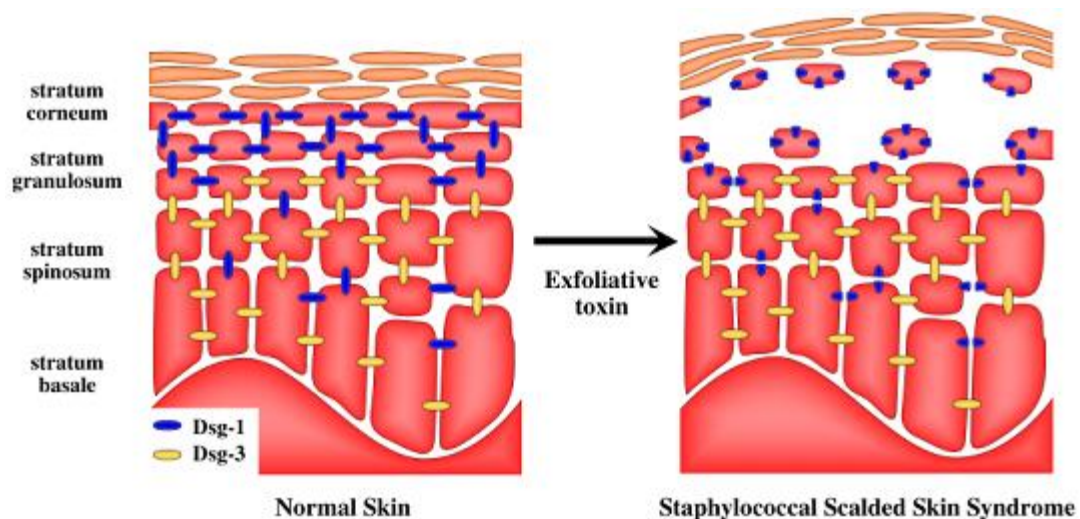


Figure 8 : l'invasion bactérienne et la formation de cloques provoquées par les ET staphylococciques (Bukowski et *al.*, 2010)

Les principales ET connues à ce jour sont les toxines exfoliatives A/B/C/D (ETA, ETB, ETC, ETD). L'ETA et l'ETB sont les plus impliquées dans les lésions cutanées humaines, tandis que l'ETC n'a été isolée que d'une infection équine et aucune association avec une maladie humaine n'a été trouvée (Oliveira et *al.*, 2018). L'ETD n'a été identifiée qu'en 2002 dans un échantillon clinique de *S. aureus* (Nishifuji et *al.*, 2008). Ces ET sont produites par environ 5 % des souches de *S. aureus*, l'ETA étant la plus répandue en Europe, en Afrique et en Amérique et l'ETB plus courante au Japon (Ladhani, 2001). La production d'ET dans certaines souches de *S. aureus* est liée à des infections épidermiques localisées telles que l'impétigo bulleux et à des maladies généralisées comme le syndrome d'épidermolyse staphylococcique (Cribier et *al.*, 1994).

II.5.2.3. Les super antigènes (SAg)

Les SAg staphylococciques font partie des plus puissants mitogènes de cellules T connus. Certaines de ces toxines stimulent les cellules T humaines à des concentrations femtomolaires. À l'origine, les SAg de *S. aureus* étaient appelées entérotoxines staphylococciques (SE) parce qu'elles provoquaient des vomissements et des diarrhées après absorption orale, caractéristiques de l'intoxication alimentaire par *S. aureus* (Grumann et *al.*, 2014). Cette caractéristique diffère toutefois de leur super antigénicité, car certains des SAg récemment identifiés sont apparemment dépourvus de propriétés émétiques, donc les SAg comprennent les entérotoxines staphylococciques (SE) qui ont des effets émétiques après administration orale et la toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1) qui n'a pas de propriétés émétiques (Lina et *al.*, 2004).

II.5.2.3. 1. Entérotoxines staphylococciques (ES)

Les SE sont des toxines libérées de 20 à 30 kDa qui perturbent l'activité intestinale et induisent une intoxication alimentaire staphylococcique (IAS), caractérisée par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et une diarrhée sans signes d'effets toxiques, tels que fièvre ou hypotension (Hennekinne et *al.*, 2012; Otto, 2014). Sur la base de l'hétérogénéité antigénique, plus de 20 ES (SEA—SEIV) ont été découverts (Fisher et *al.*, 2018). Bien que les récepteurs impliqués dans la réponse émétique aux SE n'aient pas été découverts, les signes cliniques de l'IAS ont été liés à des médiateurs inflammatoires, tels que le leucotriène B4 et la prostaglandine E2, tous deux produits en réponse aux SE (Uchiyama et *al.*, 1992). L'estomac et l'intestin grêle supérieur présentent les lésions muqueuses les plus importantes, qui sont associées à des infiltrats de neutrophiles dans l'épithélium et la lamina propria, tandis que le jéjunum présente des limites en brosse brisées et des cryptes élargies (Pinchuk et *al.*, 2010).

II.5.2.3. 2. Toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1)

Contrairement aux SE, le TSST-1 (22 kD) ne déclenche pas de vomissements mais stimule la libération de quantités substantielles de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T et les macrophages de l'hôte. Cette explosion de cytokines provoque des symptômes de syndrome de choc toxique (SCT), tels qu'une forte fièvre, une éruption cutanée, une desquamation, une hypotension et un choc hypovolémique, qui peuvent évoluer vers une défaillance multiviscérale (Ahmad-Mansour et *al.*, 2021).

Compte tenu du développement croissant des infections à SARM associées à l'expression de TSST-1, il devient donc plus difficile de les traiter et peut finalement conduire à la mort (Tab. 3).

Chapite II : Staphylococcus aureus

Tableau 3 :Toxines sécrétées par *S. aureus* (Ahmad-Mansour et *al.*, 2021).

Toxine	Propriétés et fonctions biologiques	Maladie associée
α -hémolysine	-Activité porogène -Lyse des érythrocytes, des leucocytes, des cellules épithéliales et des fibroblastes -Propriétés pro-inflammatoires	-Pneumonie -État septique
Leucocidine de Panton-Valentine (PVL)	-Activité porogène -Lyse des neutrophiles, des monocytes, des macrophages -Propriétés pro-inflammatoires	-Pneumonie -Bactériémie -Fasciite nécrosante -Infections de la peau et des tissus mous
Modulines solubles dans le phénol (PSM)	-Activité porogène -Lyse des érythrocytes, des neutrophiles, des monocytes, des protoplastes bactériens, des sphéroplastes -Propriétés pro-inflammatoires -Favoriser la formation de biofilm	-Bactériémie -Infection cutanée
Inhibiteur de la différenciation des cellules épidermiques (EDIN)	-Activité du tunnel transcellulaire -Brèches dans les cellules endothéliales	-Pneumonie -Bactériémie -Ulcère du pied diabétique
Toxines exfoliatives (ET)	-Activité de la sérine protéase -Perturbation des adhérences et des jonctions intercellulaires des cellules de l'épiderme	-Syndrome d'épidermolyse staphylococcique (SSSS)
Entérotoxines staphylococciques (ES)	-Activité superantigène -Activité pro-inflammatoire	-Intoxication alimentaire à staphylocoques -Syndrome de choc toxique
Toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1)	-Activité superantigène -Activité pro-inflammatoire	-Syndrome de choc toxique

II.5.3. Formation de Slime

Le slime est une substance produite par les communautés microbiennes, notamment dans les biofilms. Ce slime sert de matrice protectrice qui facilite l'adhésion bactérienne aux surfaces et améliore leur survie face aux réponses immunitaires de l'hôte et aux traitements antimicrobiens. La formation de slime est un facteur critique dans la pathogénicité de diverses bactéries, notamment *S.aureus* et les staphylocoques à coagulase négative, qui sont connus pour provoquer des infections persistantes en raison de leurs capacités de formation de biofilms (Oliveira et Cunha, 2008; Hammadi et Yousif, 2014 ; Rajkumar et al., 2016). La production de slime chez *S.aureus* est souvent liée à la présence de gènes *icaA* et *icaD*, responsable à la production de mucus impliqué dans la formation des biofilms chez les *S. aureus* (Bhati et al., 2018 ;Niyazi et al., 2022; Dhakarwal et al., 2024).

II.5.4. La staphyloxanthine

La staphyloxanthine est un caroténoïde triterpénoïde rouge orangé (Wieland et al., 1994; Pelz et al., 2005). C'est l'un des principaux facteurs de virulence présents dans plus de 90 % des isolats de *S. aureus* (Lennette et al., 1985). Sa production est médiée par des enzymes codées par cinq gènes (*crtOPQMN*) présents dans un groupe du chromosome staphylococcique (Liu et al., 2005 ; Pelz et al., 2005) . L'inactivation des gènes de ce groupe abolit la production de staphyloxanthine, ce qui entraîne des colonies incolores de cette bactérie (Liu et al., 2005).

La staphyloxanthine est bien connue pour sa capacité à agir comme antioxydant, possédant de multiples doubles liaisons conjuguées qui facilitent la détoxification des espèces réactives de l'oxygène générées par le système immunitaire de l'hôte (Fiedor et al., 2014). Il stabilise la membrane cellulaire en diminuant la fluidité membranaire (Mishra et al., 2011). Des travaux antérieurs ont conclu que le pigment STX peut protéger *S. aureus* contre le stress oxydatif induit par les neutrophiles. (Clauditz et al.,2006 ; Beavers et al.,2016).

De plus, la staphyloxanthine s'est avérée avoir une fonction protectrice chez *S. aureus* contre les UV (254 nm) (Pannu et al., 2019). Ce facteur de virulence crucial peut aider *S. aureus* à échapper aux défenses immunitaires innées de l'hôte. La principale caractéristique structurelle des caroténoïdes est la délocalisation abondante des électrons π du polyène, qui leur permet

Chapite II : Staphylococcus aureus

d'absorber la lumière visible, leur conférant des couleurs intenses allant du jaune au rouge (Siems et *al.*, 2002).

II.5.5. La mobilité

La mobilité est essentielle pour que les bactéries puissent échapper aux dangers et rechercher des nutriments dans l'environnement, éléments essentiels à leur virulence et à leur pathogénicité (Matilla et Krell, 2018).

Staphylococcus aureus est immobile en raison de l'absence de flagelles et de pili (Pollitt et Diggle, 2017). Cependant, cet organisme se déplace sur la surface de la gélose molle en se propageant (Kaito et Sekimizu, 2007 ; Lin et *al.*, 2016). Son mouvement est médié par l'accumulation d'eau dans une colonie et la production de biosurfactants appelés modulines solubles dans le phénol (Kaito et Sekimizu, 2007 ; Tsompanidou et *al.*, 2013 ; Lin et *al.*, 2016), qui affaiblissent la tension superficielle de l'eau, permettant à l'eau d'inonder la surface de l'agar et de propager l'organisme (Lin et *al.*, 2016).

II.5.6. Les exopolysaccharides (EPS)

L'exopolysaccharide est un élément clé de la matrice extracellulaire qui contribue à d'importants mécanismes de pathogénicité bactérienne, notamment la formation de biofilms et l'évasion immunitaire. Chez les pathogènes humains *S. aureus* et *S. epidermidis*, ainsi que chez de nombreuses autres espèces de staphylocoques, le seul exopolysaccharide est l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA), un homopolymère cationique partiellement désacétylé de N-acétylglucosamine, dont la biosynthèse est codée dans le locus *ica*. Il constitue la matrice du biofilm et protège la bactérie contre les antibiotiques et le système immunitaire (Nguyen et *al.*, 2020; François et *al.*, 2023) .

II.5.7. Formation de Biofilm

Le biofilm est une structure multicellulaire complexe qui se forme sur diverses surfaces biotiques et abiotiques, l'un des facteurs de virulence chez les staphylocoques, qui est devenue de plus en plus importante dans la pathogénèse des infections récurrentes et prolongées ces dernières années (Periasamy et *al.*, 2012). La formation de biofilm constitue un élément clé qui facilite l'émergence de la résistance aux antibiotiques pour *S. aureus* , en inhibant la pénétration des antibiotiques, ce qui entraîne une situation de plus en plus grave (Chen et *al.*, 2022 ; Kebriaei et *al.*, 2023).

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

La formation de biofilm chez *S. aureus* est un processus multiforme orchestré par des facteurs de virulence clés qui favorisent l'adhésion, l'agrégation, la maturation du biofilm et l'évasion immunitaire (Fig. 9) (Wang et al., 2024). L'adhésion in vivo aux protéines de la matrice humaine se produit via des protéines ancrées dans la paroi cellulaire et d'autres protéines de surface, dont beaucoup appartiennent à la famille MSCRAMM (Foster., 2019).

Au cours de la deuxième étape, une matrice de biofilm est produite, reliant les cellules et qui, chez *S. aureus*, est constituée de l'exopolysaccharide (Linz et al., 2023), d'ADN extracellulaire (Schwartz et al., 2012), d'acides téchoïques (Vinogradov et al., 2006) et de protéines – souvent amyloïdes – telles que SasG (Corrigan et al., 2007).

Les biofilms ne sont généralement pas entourés de larges couches de neutrophiles comme les abcès, ce qui est probablement dû au fait que dans les biofilms, *S. aureus* vit dans un état comparativement moins agressif (Beenken et al., 2004) et ne produit ni ne libère à travers la matrice du biofilm une grande quantité de molécules chimioattractives. De plus, il a été démontré que les biofilms à *S. aureus* biaisent la réponse immunitaire de l'hôte vers un état anti-inflammatoire (Thurlow et al., 2011 ; Hanke et al., 2012).

Au sein des biofilms, les cellules de *S. aureus* entrent souvent dans un état métabolique dormant, ce qui les rend résistantes à la plupart des antibiotiques ciblant les cellules en division active (Malani et al., 2024).

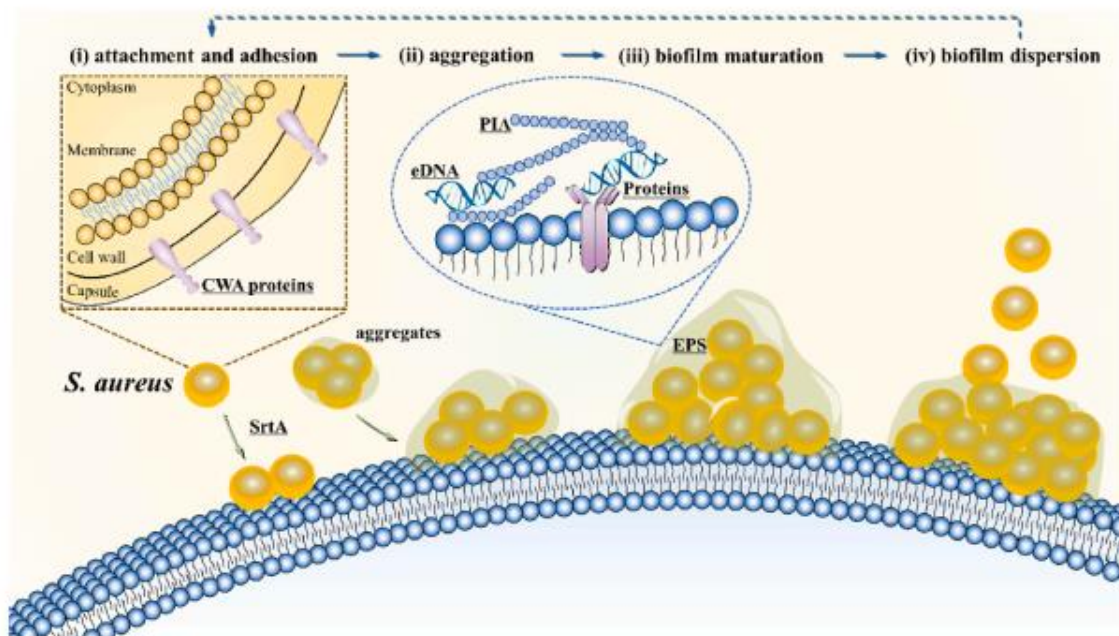


Figure 9: Processus de formation du biofilm de *S. aureus*.

Chapite II : Staphylococcus aureus

Processus de formation du biofilm de *S. aureus* : (i) fixation et adhésion initiales, où des cellules individuelles ou des agrégats adhèrent aux surfaces ; (ii) agrégation, avec division et prolifération cellulaires, ainsi que production d'EPS ; (iii) structuration et maturation du biofilm, où les micro-organismes coexistent au sein d'interactions polymicrobiennes ; et (iv) dispersion du biofilm, avec détachement cellulaire du biofilm agrégé vers l'état planctonique. EPS : substances polymères extracellulaires ; ADNe : ADN extracellulaire ; PIA : adhésine intercellulaire polysaccharidique ; protéines CWA : protéines ancrées à la paroi cellulaire ; SrtA : sortase A. Les molécules clés des cibles potentielles des antibiotiques sont soulignées.

II.6. Génétique de virulence de *Staphylococcus aureus*

Le génome bactérien est constitué de génomes centraux et accessoires. Le génome central contient tous les gènes essentiels à la survie cellulaire, tels que les gènes codant pour les molécules impliquées dans le métabolisme, la synthèse d'ADN et d'ARN, et la réplication. Le pool génétique accessoire représente la diversité au sein des espèces bactériennes en codant les protéines nécessaires à l'adaptation des bactéries dans différentes niches écologiques (résistance, facteurs de virulence, etc.). Les gènes accessoires ont généralement une teneur en G + C différente de celle du génome central, souvent parce qu'ils proviennent d'autres espèces de bactéries (Hacker et Kaper, 2000; Lindsay et Holden, 2004).

Chez les procaryotes, le transfert d'informations génétiques entre les cellules et entre différentes espèces ou genres est l'une des principales forces à l'origine des « changements radicaux » ou des sauts quantiques d'évolution (Hacker et Kaper, 2000). Les éléments d'ADN extrachromosomiques tels que les éléments génétiques mobiles « EGM » jouent un rôle crucial dans la plasticité du génome, permettant aux bactéries de s'adapter facilement à de nouveaux environnements. *S. aureus* contient de nombreux types de EGM, y compris des plasmides, des transposons (Tn), des séquences d'insertion (SI), des bactériophages, des îlots de pathogénicité et des chromosomes à cassette staphylococcique (Malachowa et Deleo, 2010) (Fig. 10). Il est remarquable que la plupart des gènes codés par les EGM restent sous le contrôle de régulateurs globaux situés dans le génome central.

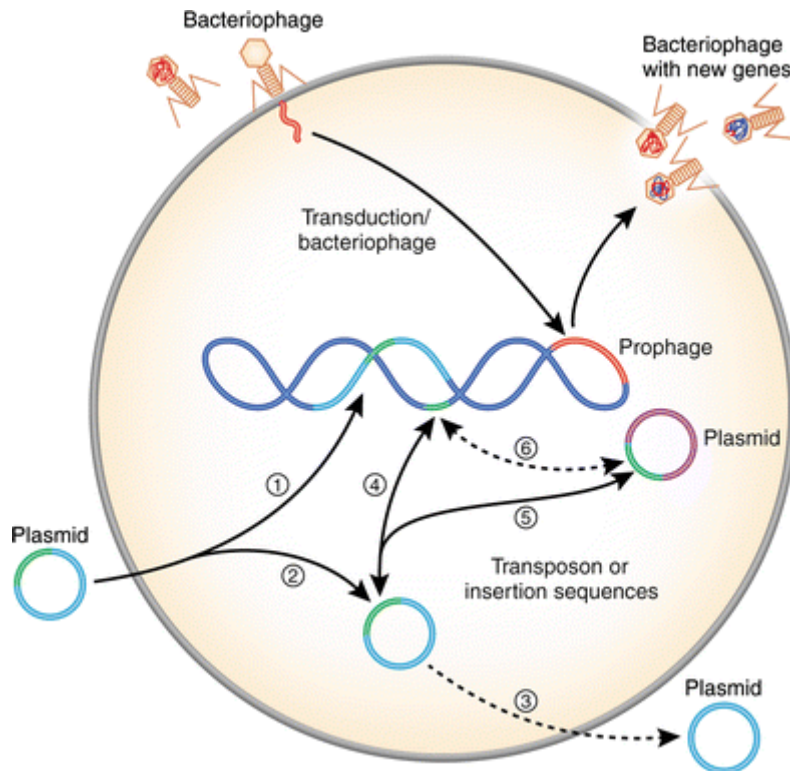


Figure 10 : Acquisition d'EGM par *S. aureus* (Malachowa et Deleo, 2010).

1 Incorporation de plasmides ou d'éléments plasmidiques dans l'ADN génomique. 2 Les plasmides peuvent être conservés sous forme d'ADN circulaire libre. 3 Plasmide suicide. 4 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion entre un plasmide et l'ADN génomique. 5 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion entre des plasmides au sein de la cellule. 6 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion de l'ADN génomique vers un autre plasmide.

II.6.1. Résistance aux antibiotiques codés par un plasmide

Les plasmides sont des molécules d'ADN autorépliquatives. Les staphylocoques portent généralement un ou plusieurs plasmides par cellule et ces plasmides ont un contenu génétique variable. Les plasmides staphylococciques peuvent être classés dans l'un des trois groupes suivants : (1) les petits plasmides multicopies qui sont cryptiques ou portent un seul déterminant de résistance ; (2) les plasmides plus grands (15 à 30 kb) à faible nombre de copies (4 à 6/cellule), qui portent généralement plusieurs déterminants de résistance ; et (3) les plasmides multirésistance conjugative (Berg et *al.*, 1998).

La pénicilline a été le premier antibiotique produit en masse pour une utilisation chez l'homme. Bien qu'initialement très efficace pour le traitement des infections à *S. aureus*,

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

aujourd'hui plus de 90 % des souches humaines de *S. aureus* sont résistantes à cet antibiotique (Olsen et al., 2006).

La résistance à la pénicilline est conférée par la β -lactamase, qui hydrolyse le cycle β -lactame de la pénicilline. Chez *S. aureus*, la β -lactamase est codée par le gène *blaZ* et les gènes régulateurs étroitement liés, *blaI* et *blaR* (Hackbarth et al., 1993). Outre la β -lactamase codée par le plasmide, les gènes *bla* peuvent être situés sur des transposons ou dans l'ADN chromosomique (Olsen et al., 2006). Plus récemment, *S. aureus* a acquis des éléments de résistance à la vancomycine à partir d'entérocoques, ce qui a entraîné l'émergence de *S. aureus* résistant à la vancomycine (VRSA) (Webb et al., 1998).

Tn 1546 code le groupe de gènes de résistance à la vancomycine au sein d'un plasmide conjugatif. Ce MGE a très probablement été transféré à *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) à partir d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) lors d'une co-infection (Webb et al., 1998; Zhu et al., 2008).

En plus des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques et des molécules impliquées dans le métabolisme, les plasmides staphylococciques codent pour la résistance à une variété d'ions organiques et inorganiques, tels que le cadmium, le mercure, l'arséniate, etc., qui sont hautement toxiques pour les cellules vivantes (Jensen et Lyon, 2009).

II.6.2. Îlots de pathogénicité et génomique de *S. aureus*

Les îlots de pathogénicité staphylococcique (SaPI) sont des MGE de 14 à 17 kb (Novick et Subedi, 2007). Les SaPI forment une famille cohérente avec des gènes centraux hautement conservés. Les gènes centraux comprennent deux cadres de lecture ouverts codant pour des protéines régulatrices de la transcription et une région codant pour l'intergrase, la protéine Rep et la terminase. En plus des gènes centraux, presque tous les SaPI codent pour des entérotoxines ou la toxine du syndrome de choc toxique (TSST) (Yarwood et al., 2002). Les SaPI peuvent être mobilisés suite à une infection par certains bactériophages staphylococciques ou par induction de prophages endogènes (Tormo et al., 2008).

Trois familles d'îlots génomiques existent parmi les souches de *S. aureus* dont les génomes ont été séquencés. Ces îlots génomiques, nommés $vSA\alpha$, $vSA\beta$ et $vSA\gamma$ codent une série de facteurs de virulence et semblent provenir des EGM, mais ont perdu la capacité d'être transférés autrement que par des modes de transfert non spécifiques aux EGM. Ils sont donc assez stables et si répandus que leur contenu peut être considéré comme caractéristique de

Chapite II : *Staphylococcus aureus*

l'espèce entière, bien que des sous-types spécifiques soient associés à différentes lignées (Kläui et *al.*, 2019).

II.6.3. Chromosome à cassette staphylococcique

Les chromosomes à cassette staphylococcique (SCC) sont des fragments d'ADN relativement volumineux qui s'insèrent systématiquement dans le gène *orfX* du chromosome de *Staphylococcus aureus*. Les SCC peuvent coder des déterminants de la résistance aux antibiotiques et/ou de la virulence. Étant donné que de nombreux SCC codent le gène de résistance à la méthicilline (*mecA*), ils peuvent être classés en chromosomes à cassette staphylococcique *mec* (SCC *mec*) ou non-SCC *mec* (Malachowa et Deleo, 2010). Toutes les souches de SARM contiennent le SCC *mec*, qui code le gène *mecA*, conférant ainsi une résistance à la méthicilline et à tous les antibiotiques β -lactamines (Chambers et DeLeo, 2009). La résistance aux antibiotiques β -lactamines est maintenue par la production d'une protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité (PBP2a), qui ne parvient pas à se lier à la méthicilline et aux autres antibiotiques β -lactamines. Par conséquent, ces antibiotiques n'inhibent pas la capacité des PBP (enzymes transpeptidases) à réticuler les polymères de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne (Ito et *al.*, 2003).

Certaines souches de *S. aureus* produisent le polysaccharide capsulaire 1, qui confère une résistance à la phagocytose. Les gènes codant pour la synthèse du polysaccharide capsulaire 1 sont situés sur un élément SCC spécial appelé SCC *cap1* (Luong et *al.*, 2002).

II.6.4. Autres éléments transposables

Les séquences d'insertion (IS) et les transposons (Tn) sont largement répartis dans le génome de *S. aureus*. Ils peuvent être présents en un seul exemplaire ou en plusieurs exemplaires sur le chromosome, ou en association avec d'autres EGM.

Les séquences d'insertion (IS) peuvent exister indépendamment dans le génome de *S. aureus*, elles se présentent souvent sous forme de paires constituant un transposon composite (Byrne et *al.*, 1989). Les IS s'insèrent dans divers loci et peuvent provoquer des changements dans l'expression des gènes du chromosome central. De plus, les IS inactivent les gènes par insertion directe ou en ayant un effet polaire sur la transcription des gènes voisins.

Les transposons (Tn) codent principalement les gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. Les transposons les plus petits sont généralement présents en plusieurs copies dans le

Chapite II : Staphylococcus aureus

génomique du staphylocoque, soit insérés dans le chromosome, soit dans des gènes de résistance multigénique (EGM), tels que SCC ou plasmides. Ce groupe comprend Tn 554 et Tn 552 , qui codent respectivement la résistance aux antibiotiques MLS_B et à la spectinomycine ou à la pénicillinase (Jensen et Lyon, 2009). En comparaison, les transposons plus grands (> 18 kbp) sont présents en copies uniques et codent pour la résistance aux antibiotiques tels que la tétracycline , le triméthoprim , les aminoglycosides ou la vancomycine.

Chapitre III :
Monographie des plantes
étudiées

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

Depuis plusieurs décennies, la résistance aux antibiotiques connaît une progression préoccupante, devenant l'un des défis majeurs pour la santé publique mondiale. La persistance et la dissémination de souches bactériennes multirésistantes entraînent une diminution de l'efficacité des traitements disponibles suite au développement de mécanismes d'adaptation qui permettent à ces bactéries de survivre malgré l'action des agents antimicrobiens. Ce déséquilibre entre l'émergence rapide de résistances et le rythme lent de mise à disposition de nouvelles thérapies accentue la gravité du problème (Spellberg et *al.*, 2004)

Face à ce constat, il devient indispensable d'explorer des stratégies alternatives ou complémentaires aux antibiotiques classiques afin de prévenir et de traiter les infections microbiennes. Parmi les approches envisagées, l'utilisation de substances d'origine naturelle suscite un intérêt croissant. Les plantes médicinales constituent en effet une ressource naturelle précieuse, riche en métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les terpènes, les tanins, les stéroïdes, les coumarines et les flavonoïdes. Ces composés, déjà exploités depuis des siècles dans la pharmacopée traditionnelle, possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes et pourraient représenter une solution prometteuse face à l'impasse thérapeutique actuelle (AlSheikh et *al.*, 2020)

Ainsi, L'exploitation scientifique et thérapeutique des produits botaniques et de leurs principes actifs apparaît comme une voie de recherche pertinente, visant à identifier de nouvelles molécules capables d'agir seules ou en synergie avec les antibiotiques existants. Une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action, de leur efficacité et de leur innocuité permettra de valoriser ces ressources naturelles dans une approche intégrée de lutte contre les infections microbiennes (Lewis , 2006; Yother, 2011).

Ce chapitre vise à mettre en évidence l'importance des plantes médicinales en tant que réservoir de biomolécules à potentiel antimicrobien aux antibiotiques. Il s'agira d'explorer les principaux groupes de composés bioactifs d'origine végétale, leurs mécanismes d'action ainsi que leur rôle éventuel comme alternatives aux antibiotiques conventionnels.

III.1. *Schinus molle*

III.1.1. Généralité sur la plante *S. molle*

Les espèces du genre *Schinus* sont depuis longtemps reconnues comme une excellente source d'ingrédients fonctionnels, notamment d'huiles essentielles et de phénols (Taylor, 2005 ; Barbosa *et al.*, 2007). Ce genre comprend environ 29 espèces originaires d'Amérique du Sud et introduites dans la plupart des régions tropicales et subtropicales du monde.

Schinus molle L., communément appelé molle, est une plante sauvage peu cultivée pouvant atteindre jusqu'à 25 m de hauteur (Fig. 11). Ses fruits, connus sous le nom de poivre rose, sont particulièrement appréciés en cuisine, notamment dans la gastronomie méditerranéenne. Sur le plan ethno-pharmacologique, *S. molle* est utilisée pour soulager les infections urinaires, les ulcères cutanés, les troubles digestifs, ainsi que divers désordres affectant les voies respiratoires, digestives et génito-urinaires. Elle est également reconnue pour ses propriétés diurétiques et carminatives (Belhoussaine *et al.*, 2022).

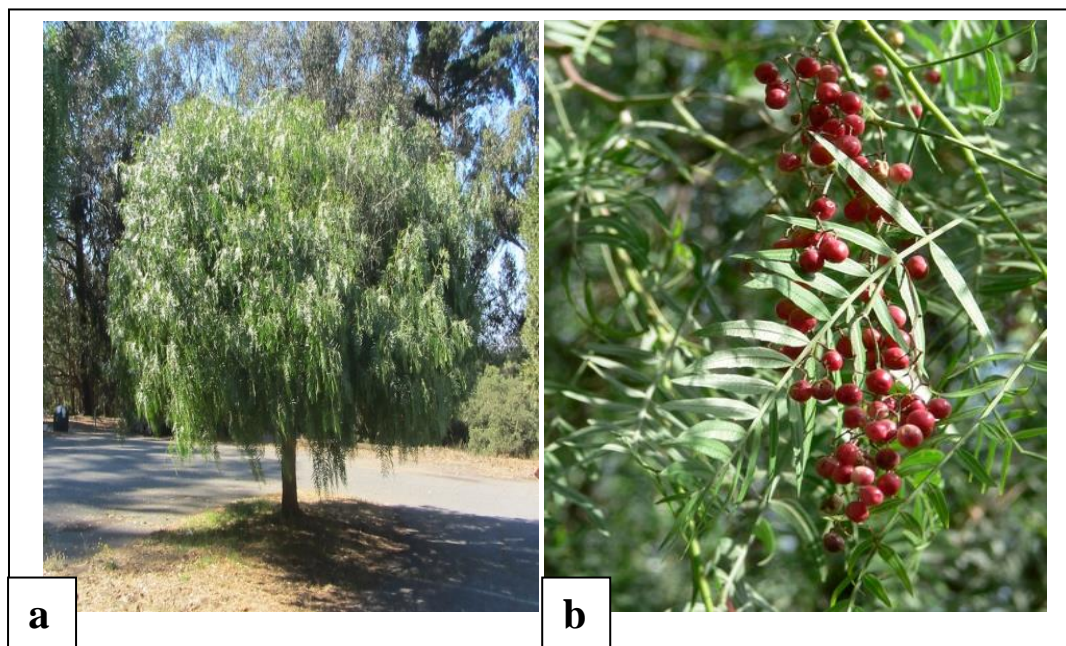


Figure 11 : *Schinus molle* ; (a) : arbre, (b) : fruits (GBIF, 2025a).

III.1.2. Répartition géographique et habitat

S. molle est originaire des régions subtropicales d'Amérique du Sud, principalement des contreforts andins et des vallées sèches du Pérou, du Chili et de l'Argentine. Elle s'est répandue par la suite dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier, notamment en Afrique, dans le bassin méditerranéen et dans le sud-ouest des États-Unis (Fig. 12). Il s'agit

d'un arbre à feuillage persistant, à croissance rapide, résistant à la sécheresse et aux fortes chaleurs. La plante prospère dans des environnements variés, des sols arides et rocaillieux aux zones plus fertiles et irriguées, ce qui explique sa grande plasticité écologique. Introduite principalement à des fins ornementales, *S. molle* est couramment planté dans les zones urbaines (parcs, jardins, trottoirs), les zones rurales (fermes, champs agricoles comme arbre d'ombrage, brise-vent ou haie), ainsi qu'en bordure de routes, de rivières, de cours d'eau ou de barrages. Sa capacité à proliférer est liée à sa croissance vigoureuse, sa production abondante de graines, et sa compétitivité pour les ressources telles que la lumière et les nutriments. Ces atouts ont favorisé son expansion rapide en dehors de son aire d'origine, où il peut devenir envahissant et perturber les écosystèmes locaux (Ramírez-Albores et *al.*, 2021; Razzak et *al.*, 2023).

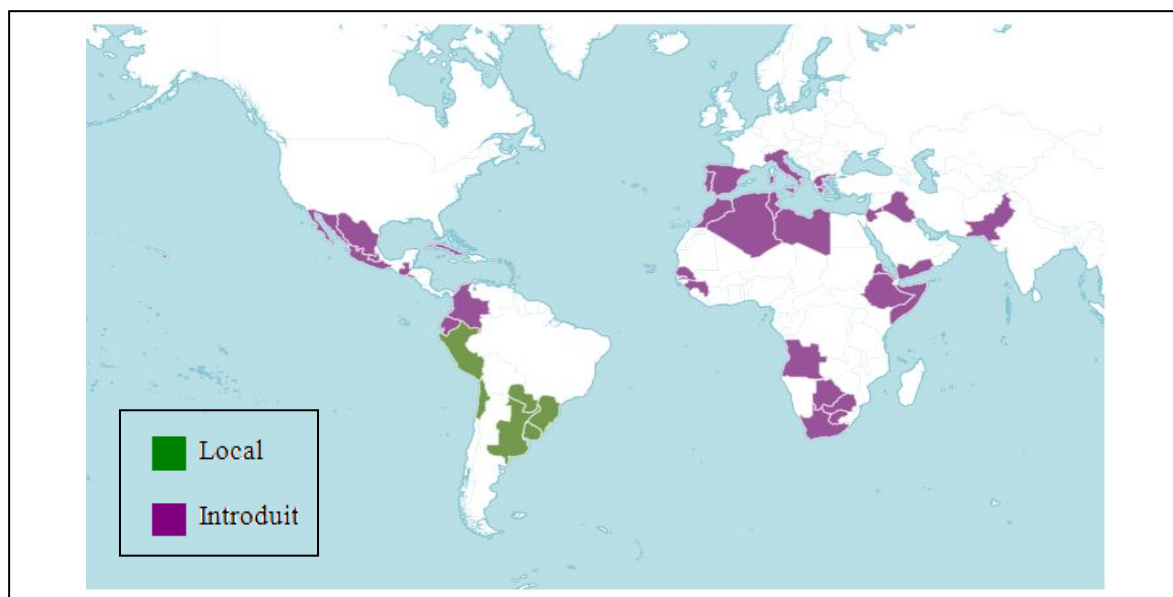


Figure 12 : Répartition géographique de *Schinus molle* (Powow, 2025 a).

III.1.3. Origine et aspect botanique

Schinus molle L., également connue sous les noms de faux poivrier, poivre péruvien, poivre américain ou poivre rose, appartient à la famille des Anacardiaceae (Kim et *al.*, 2021). Originaire d'Amérique du Sud (Mendonça Rocha et *al.*, 2012), il s'agit d'un arbre à feuillage persistant, généralement de petite taille, atteignant entre 3 et 15 m de hauteur. Il se caractérise par une écorce brun foncé, laticifère, et intensément fissurée. Ses feuilles, fines et allongées (Erazo et *al.*, 2006), sont imparipennées, avec un rachis ailé, et comportent de 20 à 40 folioles. Ces dernières sont linéaires à lancéolées, mesurant de 2 à 5 cm de long pour 0,4 à 0,8 cm de large, avec des bords entiers ou légèrement dentés (Martínez-Millán & Cevallos-Ferriz, 2005).

III.1.4. Classification botanique

III.1.4.1. Classification taxonomique

Dans la classification botanique, la famille des anacardiacees appelée aussi Térébinthacées regroupe approximativement 81 genres et 800 espèces, principalement réparties dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées (Pell et *al.*, 2011). La classification taxonomique de *S. molle* est indiquée dans le Tab. 4 (Angiosperm Phylogeny Group, 2016 ; POWO, 2025)

Tableau 4 : Classification taxonomique de *Schinus molle*

Règne	Plantae
Sous-règne	Trachéobiontes
Superdivision	Spermatophytes
Division	Magnoliophytes
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidés
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	<i>Schinus</i>
Espèce	<i>Schinus molle</i> (L., 1753)

III.1.4.2. Nomenclature

Nom arabe : شجرة الفلفل الكاذب

Nom français : faux poivrier, mollé des jardins, arbre de résine, café de chine, poivre de Californie

Nom anglais : Bresilien pepper, peruvien mastic, Californian pepper (Babab Aissa, 2000).

III.1.5. Composition biochimique de *S. molle*

S.molle est une plante riche en composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les biflavonoïdes, les tanins, les catéchines, ainsi que divers sesquiterpènes, triterpènes et stéroïdes (Farag, 2008 ; Todirascu-Ciornea et *al.*, 2019). Les principaux composés des huiles extraites de ses feuilles et de ses fruits sont principalement des monoterpènes (Abdel-Sattar et *al.*, 2010 ; Gomes et *al.*, 2013) et des sesquiterpènes (Simionatto et *al.*, 2011 ; Cavalcanti et *al.*, 2015).

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

Les huiles essentielles de *S.molle* ont fait l'objet de plusieurs recherches révélant une grande variabilité de sa composition chimique selon l'origine géographique, la saison et l'organe étudié (feuilles ou fruits). Rossini et al. (1996) et Abdel-Sattar et al. (2010) ont rapporté la prédominance du bicyclogermacrène dans les feuilles provenant d'Uruguay. Par la suite, Baser et al. (1997) ont identifié, dans les feuilles et les fruits, l' α -phellandrène comme composé majoritaire, suivi du β -phellandrène, du limonène et de l' α -cadinol.

Marongiu et al. (2004) ont confirmé cette tendance en détectant 26 constituants représentant 98,9 % de l'huile essentielle des feuilles, dont l' α -phellandrène (26,1 %) et le β -phellandrène (21 %) étaient dominants. Des travaux réalisés au Mexique la même année ont également montré une forte présence de l' α -phellandrène dans les deux parties de la plante (39,7 % dans les feuilles et 23,4 % dans les fruits). En revanche, au Pérou, Huamán et al. (2004) ont mis en évidence une composition différente dans les fruits, dominée par le myrcène (42 %), l' α -phellandrène (25 %), le limonène (19 %) et le β -phellandrène (9,7 %). Enfin, en Tunisie, Hayouni et al. (2008) ont observé une huile essentielle des fruits caractérisée principalement par l' α -phellandrène (35,9 %), le β -phellandrène (29,3 %) et le β -pinène (15,7 %).

Tableau 5: La détermination de la composition phytochimiques des extraits méthanoliques des graines et feuilles de *S.molle* par GC-MS (Shehata et al., 2025).

N°	Nom du composé	Graines%	Feuilles%	Activité
1	Germacrène B	–	3,81	Antimicrobienne
2	Azúléne	–	14,88	Anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-ulcère, anticancéreuse et antiallergique
3	6-Hydroxy-4,4,7a-triméthyl-5,6,7,7a-tétrahydrobenzofurane-2(4H)-one	3,23	–	Antitumorale, antibactérienne, anti-inflammatoire, antioxydante et antivirale
4	ζ -Muuroolène	–	9,44	Antibactérienne
5	6-Hydroxy-4,4,7a-triméthyl-5,6,7,7a-tétrahydrobenzofurane-2(4H)-one	3,68	–	Antitumorale, antibactérienne, anti-inflammatoire, antioxydante et antivirale
6	α -Guaiène	–	2,26	Non trouvé

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

7	Isoledène	–	4,08	Non trouvé
8	α -Guaiène	–	7,92	Non trouvé
9	Aromadendrène	–	2,6	Non trouvé
10	Lédène oxyde-(II)	–	–	Non trouvé
11	Acide n-hexadécanoïque	10,84	1,8	Antibactérienne et antifongique
12	Néophytadiène	–	2,1	Anticancéreuse, anti-inflammatoire, antioxydante et antipaludique
13	Acide cyclopropanebutanoïque	1,36	–	Non trouvé
14	Acide octadécanoïque, ester éthylique	2,54	–	Antimicrobienne
15	Acide hexadécanoïque, 2-hydroxy-1-(hydroxyméthyl)éthyl ester	2,9	3,3	Anti-inflammatoire et antioxydante
16	Bis (2-éthylhexyl) phtalate	59,11	–	Potentiel antibactérien et larvicide
17	Acide octadécanoïque, 2,3-dihydroxypropyl ester	3,88	4,6	Hémolytique, pesticide, arôme, antioxydant
18	Squalène	–	16,87	Antioxydant, anti-inflammatoire et anticancéreux
19	α -Amyrone	–	7,3	Non trouvé
20	Lupéol	–	12,4	Anti-inflammatoire, anticancéreux, antimicrobien, antidiabétique, cardioprotecteur et hépatoprotecteur

III.6. Propriétés biologiques de l'huile essentielle de *S. molle*

Schinus molle L. est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses multiples propriétés thérapeutiques. Les recherches scientifiques réalisées à partir d'extraits de *S. molle* ont mis en évidence une large gamme d'activités biologiques. Elle a été employée comme antibactérien, antiviral, antifongique, antiseptique topique, antioxydant, anti-inflammatoire, antitumoral, antispasmodique, diurétique, antihypertenseur, digestif, purgatif, astringent, cicatrisant, ainsi que pour soulager les douleurs dentaires, les troubles menstruels, les plaies, les rhumatismes, l'asthme, les affections respiratoires et urinaires, et même comme stimulant

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

ou antidépresseur (Bras *et al.*, 2010; Nyakudya *et al.*, 2013 ; Martins *et al.*, 2014 ; Maema *et al.*, 2016). Des extraits de ses feuilles ont montré un niveau élevé d'effet antimicrobien contre *Agrobacterium tumefaciens* et *Bacillus subtilis* (Rhouma , 2009). Il a été démontré que ses extraits et son huile essentielle inhibent les médiateurs pro-inflammatoires. Une étude menée par Yuequin *et al.* (2003) a permis l'isolement de trois composés aux propriétés anti-inflammatoires; deux acides triterpénoïdes et une biflavanone.

Certaines études ont confirmé les effets insecticides et répulsifs d'extraits de *S. molle* chez différents insectes (Abdel-Sattar *et al.*, 2010 ; Ravindran, 2017).

L'huile essentielle de *S. molle* est utilisée comme adjuvant dans diverses applications dans les produits alimentaires en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes ou comme antiparasitaire dans les bovins et l'apiculture (Guala *et al.*, 2016). Elle possède également une activité cytoprotectrice, favorisant la survie des cellules saines dans des conditions de stress. Par ailleurs, des effets analgésiques ont été rapportés, notamment dans le traitement des douleurs associées à des affections telles que l'arthrite et les troubles musculo-squelettiques (Feriani *et al.*, 2020 ; Kim *et al.*, 2021).

I.1.1 Phytotoxicité de *S. molle*

En Amérique de sud, les fruits de *S. molle* sont consommés comme épice et produisent une huile volatile qui a été utilisée comme un substitut de poivre noir (Taylor, 2005). Par contre, Kasimala, (2012) a révélé que les petites baies de *S. molle* sont réputées être modérément toxiques. Le pollen, par contact ou par inhalation, peut provoquer des réactions de dermatite et d'asthme.

III.2. *Eucalyptus globulus*

III.2.1. Généralité sur la plante *E. globulus*

Eucalyptus globulus, également connu sous le nom de « gommier bleu », est l'une des plantes médicinales les plus utilisées au monde. Il appartient au genre *Eucalyptus*, de la famille des Myrtacées (Myrtaceae) (Hayat et al., 2015). *E. globulus* est un arbre à fleurs utilisé depuis des millénaires en médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques. L'huile essentielle extraite de cette plante est largement exploitée à l'échelle mondiale dans divers domaines, notamment en pharmacie, en parfumerie, dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans les produits cosmétiques (Elangovan & Mudgil, 2023).

III.2.2. Répartition géographique et habitat

E. globulus est une espèce largement cultivée dans diverses régions du monde, notamment dans les zones à climat méditerranéen, où elle est exploitée pour ses usages pharmaceutiques, industriels et forestiers (Grattapaglia et al., 2012 ; Hayat et al., 2015). Grâce à sa remarquable capacité d'adaptation, elle est présente dans de nombreux pays situés en Afrique, en Asie, en Europe et en Amérique latine (Fig. 13).

Outre l'Australie, son lieu d'origine, les espèces du genre *Eucalyptus* se sont bien acclimatées dans plusieurs régions présentant des conditions climatiques favorables, telles que des températures modérées et une humidité suffisante (Chevalier, 1952).

En Australie, *E. globulus* couvre environ 92 millions d'hectares, soit près de trois quarts de la surface forestière naturelle. En Inde, on estime à plus de 2,5 millions d'hectares la superficie qui lui est consacrée, soulignant son importance économique, écologique et industrielle à l'échelle mondiale (Rehman et al., 2015).

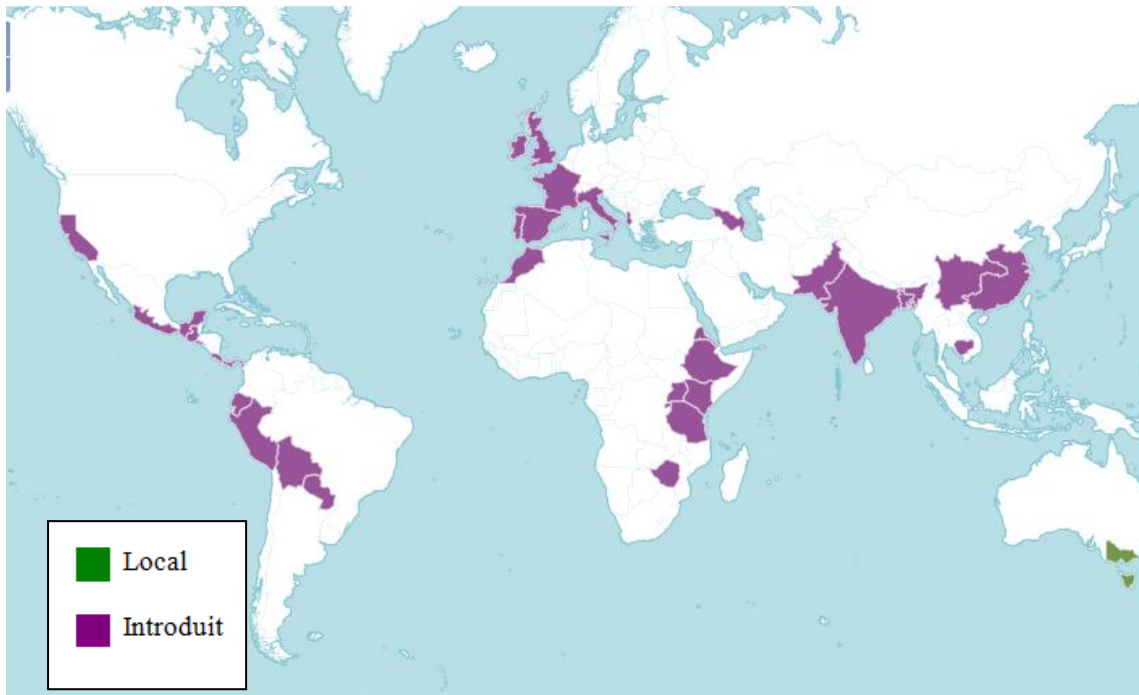


Figure 13: Répartition géographique d'*Eucalyptus globulus* (POWO, 2025b).

III.2.3. Origine et aspect botanique

Eucalyptus globulus est une espèce originaire d'Australie et de Tasmanie. Elle a été introduite par la suite dans plusieurs régions du monde, notamment en Afrique, en Amérique du Sud (zones tropicales et tempérées), ainsi que dans le bassin méditerranéen. En Algérie, cette espèce a été introduite en 1854 par Ramel (Boulekbache-Makhlouf et *al.*, 2010), et elle s'y est bien acclimatée, en particulier dans les régions du nord, où les conditions climatiques sont favorables à sa croissance (Cermelli et *al.*, 2008).

Il s'agit de l'un des arbres médicinaux les plus importants à l'échelle mondiale et l'un des genres les plus largement plantés (Elansary et *al.*, 2017). *E. globulus* est principalement cultivé dans les régions méditerranéennes, et peut croître jusqu'à 350 mètres d'altitude (Fig. 14). Il supporte une large plage de températures annuelles moyennes, comprises entre 3 °C et 40 °C, mais ne résiste pas à des températures inférieures à -5 °C. Les précipitations annuelles idéales pour son développement se situent entre 250 et 2500 mm. L'espèce se distingue également par sa grande tolérance aux sols acides, avec un pH optimal situé entre 5,5 et 6,5 (Rehman et *al.*, 2015).



Figure 14 : Arbre mature d'*Eucalyptus globulus*(GBIF, 2025b).

III.2.4. Classification botanique

III.2.4.1. Classification taxonomique

E. globulus est une espèce appartenant à un complexe taxonomique comprenant quatre sous-espèces : *Eucalyptus bicostata*, *Eucalyptus pseudoglobulus*, *Eucalyptus globulus* (sensu stricto) et *Eucalyptus maidenii*. Parmi celles-ci, la seule variété officiellement reconnue est *Eucalyptus globulus* var. *compacta* Labill., communément appelée « gommier bleu nain » (*Dwarf blue gum*). La classification taxonomique détaillée d'*E. globulus* est présentée dans le Tab. 6.

Tableau 6 : Classification taxonomique d'*Eucalyptus globulus* (Kumar & Laxmidhar, 2011).

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Superdivision	Sprematophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Eucalyptus</i>
Espèce	<i>Eucalyptus globulus</i>

III.2.4.2. Nomenclature

Nom arabe: بان أو كافور

Nom français : l'Eucalyptus

Nom anglais: Turpentine gas", "Tasmanian blue gum eucalypt", "Tasmanian blue gum", "southern blue gum", "fever tree", "blue gum eucalyptus" and "blue gum" (Orwa et al., 2009).

III.2.5. Composition biochimique d'*E. globulus*

L'huile essentielle d'eucalyptus, de couleur jaune pâle est caractérisée par un arôme camphré et terreux prononcé. Leur composition phytochimique dépend de plusieurs facteurs, tels que le stade de maturité, l'organe et l'origine géographique. Selon la norme ISO 770:2002, les constituants principaux de l'huile essentielle extraite des feuilles et des rameaux d'*E. globulus* sont le 1,8-cinéole (> 60 % à 70 %) , le d-limonène (2–15 %) et l' α -pinène (1–10 %). D'autres composés ont également été identifiés dans l'huile essentielle d'*E. globulus* à des teneurs supérieures à 0,1 %, notamment le p-cymène (1-isopropyl-4-méthylbenzène), le γ -terpinène, l' α -phellandrène, le myrcène, l' α -terpinéol, le β -pinène, le 4-terpinéol, le terpinolène, l' α -terpinène ainsi que le 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one (ISO 770:2002; Zonfrillo et al., 2022 ; Djellouli et al., 2024).

L'huile essentielle extraite des feuilles d'*E. globulus* renferme une grande diversité de composés volatils, notamment des terpénoïdes (Harkat-Madouri et al., 2015 ; Dhakad et al., 2018). En plus de ces composés volatils, elle contient également des composés phénoliques d'intérêt, tels que l'acide chlorogénique, l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide ellagique, des catéchines, ainsi que divers flavonoïdes. *E. globulus* est considéré comme une plante riche en métabolites secondaires, comprenant notamment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des propanoïdes et des tanins. Selon Barbosa et al. (2016), entre 20 et 80 composés phytochimiques ont été identifiés chez différentes espèces du genre *Eucalyptus*. Parmi les principaux composés volatils présents dans les feuilles et les jeunes pousses figurent le citronellal, le globulol, la pipérone, l' α -gurjunène, le β -pinène, l'allo-aromadendrène, ainsi que les isomères α -, β - et γ -terpinène-4-ol (Hasni et al., 2021 ; De Elguea-Culebras et al., 2022).

Les fleurs d'*E. globulus* sont particulièrement riches en sucres, notamment en dextrine et en saccharose (Stackpole et al., 2011). Quant aux fruits, ils contiennent une large gamme de composés bioactifs, incluant des acides aminés (asparagine, cystéine, glutamate, glycine, ornithine, thréonine), des composés aromatiques (citral, myrcène, myrténol, verbinone, *p*-

Chapitre III : Monographie des plantes étudiées

menthane), ainsi que d'autres substances comme le bornéol, l'eudesmol, la fenchone et l' α -terpinéol (Boulekbache-Makhlouf et al., 2010).

Tableau 7: Composition phytochimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (Čmiková et al., 2023)

N°	Composé	%
1	isobutyl isobutyrate	0,1
2	α -thujène	0,4
3	α -pinène	7,3
4	camphène	0,8
5	sabinène	1
6	β -pinène	3
7	β -myrcène	1,7
8	α -phéllandrène	1
9	d-3-carène	0,1
10	α -terpinène	1
11	p-cymène	7,7
12	α -limonène	6,9
13	1,8-cinéole	63,1
14	(E)- β -ocimène	0,2
15	γ -terpinène	3,6
16	α -terpinolène	0,6
17	trans-pinocarvéol	0,1
18	camphre	0,1
19	menthone	0,2
20	pinocarvone	0,1
21	4-terpinéol	0,2
22	α -terpinéol	0,1
23	aromadendrène	0,4

III.2.6. Propriétés biologiques de l'Huile essentielle d'*E. globulus*

On recense actuellement près de 900 espèces d'eucalyptus à travers le monde, dont environ 300 sont reconnues pour leur richesse en huiles essentielles, et une vingtaine sont utilisées à des fins médicinales dans la pharmacopée traditionnelle (Sharifi-Rad et *al.*, 2017).

En médecine traditionnelle algérienne, les feuilles d'eucalyptus sont couramment utilisées pour soulager diverses affections, en particulier les troubles respiratoires tels que le rhume, la grippe ou la congestion nasale (Cermelli et *al.*, 2008).

L'huile essentielle d'*E. globulus* est largement exploitée dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire, notamment en aromathérapie (Goldbeck et *al.*, 2014 ; Sabo & Knežević, 2019). De nombreuses études ont mis en évidence ses propriétés biologiques remarquables, elle présente des activités anti-inflammatoires, analgésiques, antivirales, antimicrobiennes, antioxydantes, insecticides et antispasmodiques (Derwich et *al.*, 2009; Okolie et *al.*, 2014 ; Ramos et *al.*, 2015 ; Rossi et *al.*, 2015). Elle est notamment utilisée dans le traitement symptomatique de la toux, des états grippaux et des inflammations. Par ailleurs, certaines recherches suggèrent un effet neuroprotecteur potentiel, ouvrant des perspectives intéressantes dans la prévention ou le ralentissement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Rashed et *al.*, 2021 ; Moreira et *al.*, 2022).

L'huile essentielle extraite des feuilles est également employée pour apaiser les douleurs musculaires et articulaires lorsqu'elle est appliquée par voie topique (Bachir & Benali, 2012 ; Ali et *al.*, 2015).

De manière générale, les composés phénoliques présents dans *E. globulus* présentent une large gamme d'activités biologiques et suscitent un intérêt croissant pour leur potentiel dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (Vuong et *al.*, 2015 ; Celeiro et *al.*, 2019).

Partie expérimentale

Chapitre I :
Matériels et méthodes

I. Matériels et Méthodes

I.1. Objectifs

Cette étude vise à caractériser et à évaluer les propriétés antibactériennes, antivirulentes et anti-quorum sensing de deux huiles essentielles de *Schinus molle* L. et d'*Eucalyptus globulus*. L'expérimentation a été structurée en trois parties successives. La première partie porte sur l'isolement et l'identification des souches cliniques de *S. aureus* à partir de différents échantillons biologiques. La deuxième partie se concentre sur l'extraction des huiles essentielles des deux plantes sélectionnées (*S. molle* et *E. globulus*), ainsi que sur leur caractérisation chimique par deux méthodes : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

La troisième partie vise à évaluer les activités antibactériennes, antivirulentes et anti-quorum sensing des huiles essentielles, ainsi qu'à étudier, par une approche *in silico*, le mode d'action des composés majoritaires sur le système de quorum sensing par amarrage moléculaire (molecular docking). Elle comprend également l'évaluation de leur toxicité et de leur potentiel thérapeutique à travers l'analyse du profil ADMET.

I.2. Lieu d'étude

L'isolement et l'identification des souches de *Staphylococcus spp.* ont été réalisés au sein de l'hôpital Yessad Khaled, Mascara.

L'extraction des HEs et leurs applications bactériologiques ont été réalisés au niveau du Laboratoire de recherche en Géo-Environnement et Développement des Espaces (LGEDE) de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara Algérie.

I.3. Isolement des souches bactériennes

Les souches bactériennes cliniques ont été isolées à partir de différents prélèvements biologiques (urines, pus et sperme) provenant d'un total de 60 patients présentant des infections d'origines diverses. L'analyse microbiologique, effectuée au laboratoire de l'hôpital, a permis d'isoler différentes espèces appartenant au genre *Staphylococcus*. Notre étude s'est concentrée spécifiquement sur *Staphylococcus aureus*, compte tenu de sa pertinence clinique et de son potentiel de multirésistance aux antibiotiques (Tab. 8 ; Tab. 9).

Tableau 8: Détails sur l'origine d'isolement des souches microbiennes étudiées

Souches	Genre et espèce	Gram	Origine de prélèvement
S01	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Sperme
S02	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Sperme
S03	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Urine
S04	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Urine
S05	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Urine
S06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Pus

Tableau 9: Description des souches mutantes de *Staphylococcus aureus* utilisées dans cette étude.

Nom de la souche	Abréviation	Description
Methicillin –Resistance <i>Staphulococcus aureus</i>	MRSA	<i>Staphulococcus aureus</i> résistante a la Méricilline
NE1532	Agr A	Souche mutée a été dérivée de <i>S. aureus</i> résistance à l'érythromycine
NE95	AgrB	Souche mutée a été dérivée de <i>S. aureus</i> résistance à l'érythromycine
NE873	AgrC	<i>S. aureus</i> mutée qui code pour le gène accessoire régulateur de la protéine C, ainsi que sa résistance contre l'érythromycine
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S.aureus</i>	Souche sauvage

La bactérie *Chromobacterium violaceum* (CECT 494), productrice de violacéine, a été utilisée pour tester l'activité anti-quorum sensing des deux huiles essentielles.

I.3.1. Isolement et identification des souches de *S. aureus*

I.3.1.1. Pré identification des souches isolées

L'observation macroscopique des cultures consiste à décrire la forme et la taille des colonies, leur opacité, l'aspect de leur surface, ainsi que leur consistance et leur pigmentation (Sébastien, 2018). Les différentes souches microbiennes ont été isolées sur le milieu sélectif Chapman, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Des repiquages successifs ont été effectués sur le même milieu sélectif afin de vérifier la pureté des souches avant d'entreprendre l'étape d'identification. L'identification bactérienne a été réalisée par une caractérisation phénotypique et génotypique (Amini et al., 2011).

I.3.1.2. La recherche de l'enzyme de respiration (catalase)

La catalase empêche l'accumulation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, en catalysant la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. L'oxygène libéré se dégage sous forme de bulles gazeuses (Reiner, 2010).

Pour réaliser le test, une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 % est déposée sur une lame propre. Une colonie bactérienne, prélevée à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, est ensuite mise en contact avec la goutte. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement immédiat de bulles d'oxygène, indiquant une réaction positive (catalase +).

I.3.1.3. Test de coagulase

Les tests de coagulation ont été réalisés à l'aide de plasma de lapin. Des colonies bactériennes ont été inoculées dans un tube à essai stérile contenant 5 mL de bouillon cœur-cerveau (BHIB) et incubées à 37 °C pendant 24 h. Pour chaque test, 0,3 mL de suspension bactérienne ont été mélangés avec 0,3 mL de plasma dans un tube stérile. Les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C et la formation de caillots a été vérifiée toutes les 30 minutes pendant 4 heures (Kloss et Wolfshohl, 1982).

I.3.1.4. Recherche de la désoxyribonucléase (ADNase)

Les colonies bactériennes sur gélose nutritive ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et repiquées sur la surface d'une gélose DNase. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C

pendant 18 à 24 heures. Elles ont ensuite été inondées par du HCl (1 N). L'observation d'une zone claire autour des colonies a été recherchée et enregistrée (Kateete et *al.*, 2010).

I.3.2. Détection de la production de slime

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur ce milieu (Rewatkar et Wadher, 2013). Le test a été réalisé sur la gélose au rouge Congo (gélose TSBS contenant 0,08 % de rouge Congo). Le milieu a été versé dans des boîtes pétries. Après solidification du milieu, les cultures de *S. aureus*, de 24 heures, ont été ensemencé par des striés à l'aide d'une anse de platine stérilisée et incubée à 37 °C pendant 24 h (Freeman et *al.*, 1989). L'intensité de la coloration noire autour des colonies indique la production de slime.

I.3.2.2. Etude de la formation de biofilm

Cette technique est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (Djordjevic et *al.*, 2002). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet la quantification du biofilm formé (Musk et *al.*, 2005).

Une suspension bactérienne (DO 600 nm = 0,6) est préparée, dans un tube bouillon nutritif, à partir d'une culture de 24 heures de *S.aureus*. La suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 0.5 ml. La suspension bactérienne a été inoculée dans 1 ml de TSB additionné de 1 % de glucose. Après l'incubation à 37 °C pendant 24 h, les tubes sont rincés par l'eau distillée stérilisée, afin d'éliminer les cellules planctoniques non adhérentes. La formation de biofilm est révélée par la coloration par une solution aqueuse de cristal violet à 1 % (m/v). Après 45 minutes, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un rinçage abondant des parois du tube à l'eau distillée (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre. La présence d'anneaux colorés sur les parois des tubes a confirmé la production de biofilm (Liesse Iyamba et *al.*, 2011).

I.3.3. Identification moléculaire par séquençage de l'ARNr 16S

Les souches de *Staphylococcus aureus* isolées et identifiées par leurs caractéristiques phénotypiques ont été confirmées par le séquençage de l'ARNr 16S, au niveau du Centre de recherche et de pratique en laboratoire, Université d'Iğdır, Iğdır, Turquie.

Matériels et Méthodes

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée par lyse par ébullition à 100 °C pendant 10 min, puis les bactéries en suspension ont été centrifugées à 15 000 g pendant 10 min. Les séquences des amorces de réaction en chaîne par polymérase (PCR) (amorces universelles) étaient celles décrites précédemment: 27 amorces directes, 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' et 1492 amorces inverses, 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (Socohou et *al.*, 2021). Le test PCR a été réalisé en utilisant le Master Cycler gradient PCR (Eppendorf® Master cycler Personal). Le programme d'amplification a été réalisé avec le cycle de dénaturation suivant : 94 °C pendant 3 min, en plus de la dénaturation 30 cycles en 30 s et 94 °C, recuit 50 °C, 30 s et extension 72 °C, 1,5 min, enfin élongation 72 °C, 10 min. Ensuite, après avoir accompli les cycles de PCR, une dernière procédure d'extension a été mise en œuvre à 72 °C pendant 5 minutes, en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % coloré avec l'acide nucléique RedSafe™ détermine les produits amplifiés par PCR. L'électrophorèse a été réalisée à 80 V pendant 90 min et observée en utilisant la lumière UV et GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) comme marqueur de poids moléculaire. Ensuite, le kit d'extraction de gel PCR QIAquick (QIAGEN) a été utilisé pour purifier les produits de PCR. Par ailleurs, Macrogen (Pays-Bas) a réalisé le séquençage Sanger des gènes d'ARNr 16S amplifiés. La comparaison des séquences finales avec celles de la base de données Genbank a été réalisée à l'aide du logiciel NCBI BLAST. Enfin, les séquences des échantillons ont été alignées à l'aide du logiciel Crustal et un arbre phylogénétique a été réalisé.

I.3.4. Test d'antibiogramme

L'antibiogramme est une technique de référence destinée à déterminer le profil de sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques, dans une perspective thérapeutique. Son principe repose sur la mise en contact, *in vitro*, la souche étudiée avec l'antibiotique, puis à déterminer leurs effets sur la croissance et la viabilité bactériennes.

L'antibiogramme par diffusion en utilisant des disques en milieu gélosé Mueller-Hinton a été adapté afin de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des souches de *S. aureus* étudiées (Magiorakos et *al.*, 2012).

Les antibiotiques étudiés sont : Chloramphenicol (C; 30µg), Ciprofloxacine (CIP; 5µg), Gentamicin (CN; 10µg), Tétracycline (TE; 30µg), Cotrimoxazole (COT; 25µg), Oxacilline (OX; 1µg), Amikacine (AK; 30µg), Norfloxacine (NX; 10µg), Cefazoline (CZ; 30µg), Rifampine (RA; 5µg), Pristinamycine (PT; 15µg).

Matériels et Méthodes

La recherche de la résistance a été réalisée sur des souches *S. aureus* pré cultivé dans le bouillon LB à 37 °C pendant 24 h. Les suspensions (1×10^6 UFC/ml) ont été ensemencés sur des surfaces de gélose Mueller Hinton. Les disques d'antibiotiques cités ont été placés sur la surface de la gélose solidifiée. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Les différents diamètres de la zone d'inhibition créée autour de chaque disque ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les tests ont été réalisés en triplicata.

I.4. Matériel végétal

I.4.1. Récolte

Les deux plantes médicinales ont été récoltées dans la région de Mascara; Les feuilles de l'espèce *Schinus molle* ont été récolté dans la région «Mamounia», durant le mois de Mars. Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* ont été obtenues dans la région «Aouf » durant le mois d'Avril, (Fig. 15, Tab. 10). Les deux plantes médicinales ont été identifiées par le Pr Righi Kada, botaniste au département d'Agronomie à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Mustapha Stambouli, Mascara-Algerie. Les feuilles des deux plantes ont été nettoyées et ensuite séchées à l'ombre pendant une semaine, puis broyées en poudre fine afin d'obtenir un maximum d'huile essentielle (Fig. 16a et Fig.16b) (Boukraâ et al., 2021).

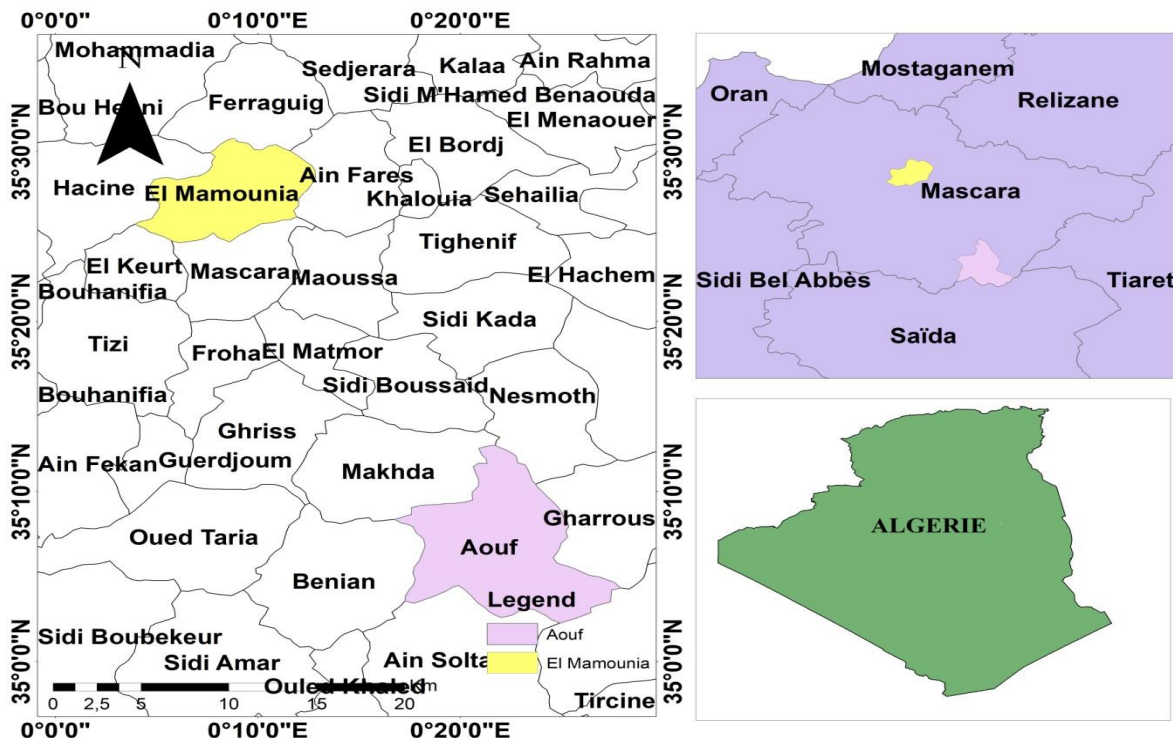


Figure15: Situation géographique des sites d'échantillonnage au niveau de la Wilaya de Mascara (ArcGIS 10.4.1).



Figure 16: Feuilles des plantes étudiées: *Schinus molle* (a) et *Eucalyptus globulus* (b).

Tableau10: Situations géographiques des stations de récolte

Station Mascara	Plante	Latitude	Longitude	Altitude	Etage bioclimatique
El-Mamounia	<i>S. molle</i>	35°25'17.9"N	0°08'21.6"E	450.7m	Semi-aride
Aouf	<i>E. globulus</i>	35°05'39.4"N	0°21'25.8"E	658m	Semi-aride

I.4.2. Extraction des huiles essentielles

Le principe de l'hydrodistillation consiste à faire bouillir le mélange d'eau et de plantes pour que les cellules végétales s'éclatent et libèrent des molécules odorantes, qui sont ensuite emportées par la vapeur d'eau générée ils passent dans un refroidisseur d'eau, où ils se condensent, sont ensuite collectés dans un récipient opaque (Abdelli,2017).

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger pendant 3 heures. Une quantité de 200 g des feuilles séchées et broyées a été ajoutée à 500 ml d'eau distillée dans un ballon de 2 litres. L'ensemble a été placé dans un chauffe-ballon fixé à un réfrigérateur pour assurer la condensation des huiles essentielles (Fig.17). A l'issue de la distillation, on observe deux phases, une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase organique (huile essentielle), moins dense que l'eau. L'huile essentielle a été stockée dans des flacons en verre sombre et conservés à 4°C jusqu'à son analyse (Hakim et *al.*, 2025).

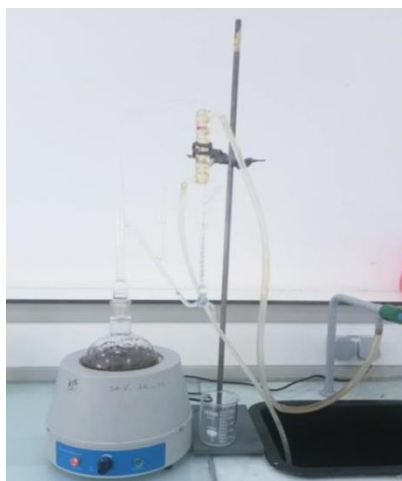


Figure17 : Dispositif Clevenger pour l'extraction des HEs

I.4.3. Calcul des rendements d'extraction

Le rendement des différentes huiles essentielles obtenues est calculé selon le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse du matériel végétal utilisée (Hakim et *al.*, 2025). Ce rendement est exprimé en pourcentage et calculé par l'équation (1) :

$$R\% = \frac{\text{Masse de l'huile essentielle (g)}}{\text{Masse initiale de la matière végétale (g)}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

I.4.4. Analyse des caractéristiques physicochimiques des HEs

L'analyse des caractéristiques physico-chimiques des deux huiles essentielles de *S. molle* et *E.globulus* porte sur la mesure de la densité, des indices de réfraction, d'acide, d'ester et du pouvoir rotatoire. Ces caractéristiques constituent des références de qualité propres à chaque essence.

I.4.4.1. Densité relative à 20°C (NF ISO 279, 1999)

La détermination de la densité relative a été réalisée à l'aide d'un pycnomètre de 1 ml de volume et une température de 20°C. La densité est calculée par l'équation (2):

$$D_{20} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_1 - m_0)} \dots \dots \dots (2)$$

m₀: masse en g du pycnomètre d'un millilitre vide,

m₁: masse en g du pycnomètre remplis d'eau distillée,

m₂: masse en g du pycnomètre remplis de l'huile essentielle.

I.4.4.2. Indice de réfraction (NF ISO 280, 1999)

L'indice de réfraction a été établi en lisant directement les indices de réfraction situés entre 1.3000 et 1.7000 à l'aide d'un réfractomètre ABBE, avec une précision de ± 0.0002 , les mesures sont effectuées à 20°C.

I.4.4.3. Pouvoir rotatoire (NF ISO 592, 1999)

Le pouvoir rotatoire des huiles essentielles a été déterminé à l'aide d'un polarimètre type VISTA C25 équipé d'une lampe au sodium ($\lambda = 589$ nm). 0.2g de l'huile essentielle est rempli dans le tube. Puis le tube de 200 mm (dm) de longueur est placé dans le polarimètre et la lecture de la mesure de l'angle de rotation est effectuée a une température de 20°C. Le pouvoir rotatoire est exprimé par l'équation (3)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{R}{(C*L)} \dots\dots\dots 3$$

R: Angle de rotation et plan de polarisation mesuré en degrés au polarimètre,

C: Concentration de la substance en g/100 mL solution,

L: Longueur du tube de polarimètre contenant la solution exprimée en centimètre.

I.4.4.4. Indice d'acide (NF ISO 1242, 1999)

L'indice d'acidité (IA) représente la quantité en milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) requise pour neutraliser les acides libres présents dans 1g d'huile essentielle. 0.7 g d'huile essentielle a été incorporé dans 5 ml d'éthanol à 95%, ainsi que 0,5 ml de phénolphtaléine à 0,2%. La solution a été neutralisée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (0,1 mol/L). Le calcul de l'IA était donné par la formule (4):

$$IA = 5.61 \times \frac{V}{M} \dots\dots\dots 4$$

5,61 : correspond à 0,1 mol/L de KOH

M : masse de l'huile essentielle (g)

V : volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 mol/L) utilisée pour le titrage.

I.4.4.5. Indice d'ester (NF ISO 709, 2002)

L'indice d'ester (IE) correspondait au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle. 2 g d'huile essentielle ont été ajoutés à 25 ml de solution d'hydroxyde de potassium (0,5 mol/L). Après chauffage du mélange pendant une heure, la solution a été ajoutée à 20 ml d'eau distillée et à 0,5 ml de phénolphtaléine à 0,2 %. L'excès de solution de KOH a été titré avec de l'acide chlorhydrique à 0,5 mol/L. Un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs. Le calcul de l'IE a été donné par la formule (5):

$$IE = \left(28.05 \times \frac{(V_0 - V_1)}{M} \right) - IA \dots\dots\dots(5)$$

28,05 g/L : correspondant à 0,5 mol/L de KOH

M : masse de l'huile essentielle (g)

V₀ : volume en ml de la solution d'HCl (0,5 mol/L) utilisée pour le blanc

V₁ : volume en ml de la solution d'HCl (0,5 mol/L) utilisée pour déterminer l'IE de l'HE.

I.4.5. Analyse des huiles essentielles par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrométrie infrarouge est une technique d'analyse basée sur l'absorption de la lumière infrarouge par les molécules organiques. Chaque liaison chimique absorbe à une longueur d'onde précise, ce qui permet d'identifier les groupes fonctionnels et les molécules présentes (information qualitatif). L'intensité de l'absorption est proportionnelle à la concentration du groupe chimique concerné, selon la loi de Beer-Lambert (information quantitatif) (Rouessac,1992).

L'analyse des propriétés structurales des deux huiles essentielles par la méthode FTIR a été enregistrée entre les spectres d'absorption entre 4000 et 400 cm⁻¹ par un spectromètre Shimadzu FTIR 4700 (Agatonovic et *al.*, 2020).

I.4.6. Analyse chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

C'est une technique parfaitement adaptée à l'analyse des huiles essentielles au regard de leur composition chimique, caractérisée principalement par la présence de molécules volatiles. Elle permet l'identification qualitative et quantitative des différents constituants d'une huile essentielle. Le couplage de la CPG au spectromètre de masse (CPG/SM) permet de fournir des informations sur la nature et la structure des molécules présente dans l'huile (Dehoffman et *al.*, 1994).

L'identification des composés chimiques des huiles essentiels des deux plantes *S. molle* et *E.globulus* a été réalisée par le GC-MS sur un GC7890A Agilent Technologies équipé d'un spectromètre de masse triaxial 5975 et utilisant une colonne capillaire HP⁻⁵ ms (30 m × 250 µm × 0,25 µm). La tension d'ionisation a été fixée à 70 eV et l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 mL/min.

La température a été maintenue à 100 °C pendant 10 min, puis augmentée à 200 °C à un débit de 5 °C/min, et maintenue pendant 20 min, puis à 5 °C/min jusqu'à 270 °C pendant 36 min, pour une durée totale de 100 min.

Les composés présents dans les échantillons ont été identifiés par comparaison avec la bibliothèque NIST, les spectres de masse ont été enregistrés dans la plage de balayage 50–550 m/s (Erenler et *al.*, 2016).

I.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

L'étude de l'activité biologique a été réalisée sur les souches bactériennes de *S.aureus* isolées et les souches de référence (Tab.8 et Tab.9).

I.5.1. Méthode de diffusion sur milieu solide

Les effets antibactériens des huiles essentielles (HE) de *S. molle* et *E. globulus* ont été évalués *in vitro* en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide (Chebaibi et al., 2016 ; Noumi et al., 2010, 2011). Pour cela, une série de concentrations croissantes des HE a été préparée par dilutions binaires. Les huiles ont été solubilisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 %, qui ne présente aucun effet antimicrobien. Les solutions préparées ont été stérilisées par filtration à l'aide de filtres stériles de porosité 0,22 µm. Une culture jeune de *S. aureus* âgés de 18 h a été utilisée pour préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile (0,8 % NaCl), ajustée à une densité équivalente au standard de 0,5 McFarland, correspondant à une concentration finale de 10⁶ UFC/mL (Noumi et al., 2011). Les suspensions calibrées ont été déposées sur la surface de plaques de gélose Mueller-Hinton (MHA) par écouvillonnage, en effectuant des stries pour assurer une distribution homogène. Des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de différentes concentrations d'HE (C1 = 200 mg/mL, C2 = 100 mg/mL, C3 = 50 mg/mL, C4 = 25 mg/mL et C5 = 12,5 mg/mL) avec un volume de 20 µL par disque. Les disques imprégnés de DMSO à 10 % ont été utilisés comme contrôle négatif.

Les disques ont été placés sur les plaques inoculées à l'aide d'une pince stérile, dans des conditions aseptiques, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques (en mm). Chaque expérience a été réalisée en triplicata pour assurer la reproductibilité des résultats :

- Non sensible (-) de diamètre inférieur ou égal à 8 mm.
- Sensible (+) pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm.
- Très sensible (++) pour un diamètre compris entre 14 et 20 mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour un diamètre égal ou supérieur à 2 mm (Pibiri, 2005).

I.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de *S. molle* et *E. globulus* a été déterminée en utilisant la méthode de micro-dilution sur microplaques à 96 puits. La CMI a été définie comme la concentration la plus faible inhibant complètement la croissance bactérienne. Le bouillon Mueller-Hinton a été utilisé comme milieu de culture. Dans chaque puits, 50 µL de bouillon ont été ajoutés. Une solution mère d'huile essentielle (400 mg/mL) a été préparée dans 10 % de DMSO, puis diluée pour obtenir une concentration initiale de 200 mg/mL dans le premier puits. Une série de dilutions binaires successives (1/2) a été réalisée afin d'obtenir les concentrations suivantes : C2 = 100 mg/mL, C3 = 50 mg/mL, C4 = 25 mg/mL, C5 = 12,5 mg/mL, jusqu'à C8 = 1,56 mg/mL. Ensuite, 50 µL de la suspension de *S. aureus*, ajustée à 0,5 McFarland (environ 10⁶ UFC/mL), ont été ajoutés dans chaque puits. Les microplaques ont été recouvertes d'un couvercle stérile et incubées à 37 °C. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la densité optique à 620 nm à différents intervalles (0, 2, 18 et 24 h) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Derwich et *al.*, 2010 ; Chandrasekaran et Venkatesalu., 2004).

I.6. Inhibition du Quorum sensing de *Chromobacterium violaceum*

Le quorum sensing est un système de communication bactérienne intra- et inter-espèces. Le QS est basé sur de petites molécules, appelées autoinducteurs, diffusibles dans le milieu extracellulaire quand la concentration bactérienne atteint un niveau maximum (Ng et Bassler, 2009). L'effet inhibiteur des HEs de *S. molle* et d'*E. globulus* sur le QS a été évalué à l'aide de deux tests portant sur la production de violacéine par *C. violaceum* (CECT 494) (Fig. 18).

I.6.1. Production de violacéine

L'inhibition de la production de violacéine, utilisée comme marqueur du QS, a été évaluée selon la méthode de Truchado et *al.* (2009). 100 µL d'une culture fraîche de *C.violaceum* CECT 494 (24 h) ont été répartis uniformément sur les plaques contenant du milieu Luria Bertani (LB). Ensuite, des disques de papier Watman stériles imprégnés de concentrations variables d'huile essentielle (12,5, 25, 50, 100 et 200 mg/mL) ont été déposés sur la gélose inoculée, puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

L'activité anti-quorum sensing a été évaluée en mesurant le diamètre (mm) du halo incolore entourant le disque, indiquant l'absence de production de violacéine (Merghni et *al.*, 2018).

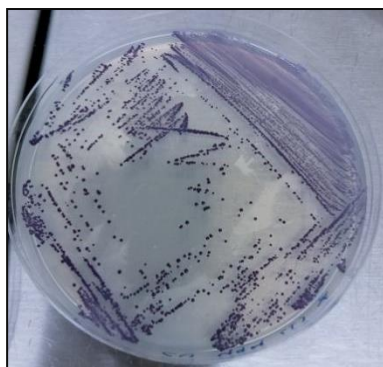


Figure 18: Aspect culturel de *Chromobacterium violaceum* CECT 494 sur le milieu Luria Bertani .

A- Quantification de la violacéine

La quantification de la violacéine a été réalisée selon la méthode décrite par Truchado et *al.*(2009). Environ, 10 μ L d'une culture jeune de *C. violaceum* a été dilués dans 2 mL de bouillon Luria Bertani (LB) et incubés à 30 °C pendant 18 heures, en présence ou en absence d'huile essentielle à des concentrations entre 0, 12.5, 25, 50, 100 et 200 mg/mL. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 6000 x g pendant 10 minutes pour obtenir des culots cellulaires. 500 μ L de la DMSO a été ajouté aux culots, suivi d'une agitation par vortex et d'une centrifugation ultérieure à 10 000 \times g pendant 15 minutes. Le pigment violacéine dissous dans le surnageant a été quantifié en transférant 200 μ L dans une plaque à 96 puits.

L'absorbance a été mesurée à 585 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques, afin de comparer la production de violacéine au témoin (bouillon LB + souche seule). Le pourcentage d'inhibition de la violacéine par les HEs a été calculé à l'aide de l'équation (6).

$$\text{Inhibition de la violacein}\% = \left(\frac{DO \text{ de Control} - ODI \text{ échantillon}}{DO \text{ de control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

I.7. Determinacion de l'effet des HEs sur les facteurs de virulences

I.7.1. L'effet sur la production de staphyloxanthine.

La staphyloxanthine est un pigment caroténoïde jaune doré produit par certaines souches de *S. aureus*. L'effet des huiles essentielles (HEs) sur la synthèse de la staphyloxanthine a été évalué à l'aide de la technique d'extraction à l'éthanol.

Environ, 20 μ L d'une culture de 24 heures de *S. aureus* ont été ajoutés à 2 mL de milieu Luria Bertani (LB) contenant de l'HE (0.25, 25, 50, 100 et 200 mg/mL). Les cultures ont été incubées

Matériels et Méthodes

à 37 °C sous agitation à 250 tr/min pendant 24 heures. Après incubation, les échantillons ont été centrifugés à 8000 × g pendant 10 minutes pour obtenir des culots cellulaires, qui ont ensuite été lavés deux fois avec du tampon phosphate salin stérile (PBS). Les culots ont été suspendus dans 2 ml d'éthanol et incubés à 40 °C pendant 20 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 8000 × g pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 465 nm. Le pourcentage d'inhibition de la production de staphyloxanthine a été calculé à l'aide de la formule (7) (Lan et al., 2010).

$$\% \text{ Inhibition} = \left(\frac{(\text{DO de Control a } 462 \text{ nm} - \text{DO de Traité a } 462 \text{ nm})}{\text{DO de Control a } 462 \text{ nm}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (7)$$

I.7.2. Inhibition des Exopolysaccharide (EPS)

L'inhibition des EPS a été réalisée à l'aide de la méthode colorimétrique décrite par Viszwapriya et al. (2016). En bref, 10 µL des cultures jeunes de *S. aureus* ont été inoculées dans des plaques à 24 puits contenant des lames de verre stériles (5/5). Les cultures ont été incubées avec ou sans les HES à différentes concentrations (12,5, 25, 50, 100 ou 200 mg/mL) à 30 °C pendant 18 h. Après incubation, les lames de verre ont été lavées avec de l'eau distillée stérilisée et remises en suspension dans 500 µL de solution saline à 0,9 %. Par la suite, 500 µL de phénol à 5 % ont été ajoutés à la suspension, suivis de l'ajout de 2500 µL d'acide sulfurique concentré. Le mélange a été incubé pendant 1 heure dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 490 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'EPS a été calculé à l'aide de la formule de l'équation (8).

$$\% \text{ d'inhibition} \left[\frac{A0 - A1}{A0} \right] \times 100 \dots \dots \dots (8)$$

A0 l'absorbance des échantillons témoins, A1 l'absorbance des échantillons traités.

I.7.3. Inhibition de la motilité

L'effet des huiles essentielles sur la motilité de *Staphylococcus aureus* a été évalué selon Kearns (2010). Les plaques pour l'essai d'étalement ont été préparées en dissolvant 15 g de bouillon TSB et 1,7 g d'agar dans 460 mL d'eau distillée, autoclavées puis refroidies à 55 °C pendant 30 minutes. Une solution de glucose (4,5 g dans 40 mL d'eau, 50 mM) a été stérilisée par filtration (0,2 µm) et ajoutée au milieu refroidi pour obtenir un support homogène pour l'étalement bactérien.

Les boîtes de Pétri de 9 cm ont été remplies par 25 mL du milieu combiné. Les boîtes contenant le milieu de culture ont été préparées avec et sans les HEs à différentes concentrations (12,5, 25, 50, 100 et 200 mg/mL). Les plaques ont été laissées sécher pendant 30 minutes dans une armoire de sécurité avec les couvercles placés à côté des boîtes. Les souches testées ont été inoculées par point au centre des boîtes de Pétri à l'aide d'un cure-dent stérile. Des boîtes sans HE ont été utilisées comme témoins. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Les diamètres des zones de motilité étalée ont été mesurés.

I.7.4. Inhibition de la production de Slime

L'inhibition de la production de slime par les HEs de *S. molle* et *E. globulus* a été évaluée à l'aide de la méthode de la gélose au rouge Congo (Lee et al., 2016). Le test a été réalisé dans des microplaques à 6 puits. La gélose au rouge Congo a été préparée en dissolvant 37 g/L de bouillon d'infusion cœur-cerveille (BHI), 36 g/L de saccharose, 15 g/L d'agar et 0,8 g/L de colorant rouge Congo.

Les souches ont étéensemencées sur la gélose au rouge Congo préalablement supplémentée avec les HEs aux différentes concentrations. Un témoin sans HE a été préparé en parallèle (témoin négatif). Toutes les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. L'inhibition de la production de slime a été mise en évidence par l'absence de coloration noire des colonies, conformément à la description de Freeman et al. (1989).

I.7.5. Inhibition de la formation du biofilm

L'inhibition de la formation du biofilm a été évaluée selon la méthode décrite par O'Toole et Kolter (1998). Les suspensions bactériennes des souches de *S. aureus* (1 µL) ont été inoculées dans des microplaques à 96 puits contenant 100 µL de bouillon LB supplémenté avec différentes concentrations d'HEs (0,25 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mg/mL). Le puits témoin contenait uniquement le milieu de culture, sans inoculum bactérien. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, les cultures ont été éliminées et les puits ont été lavés délicatement trois fois avec du PBS stérile afin d'éliminer les bactéries planctoniques. Chaque puits a ensuite été traité avec 100 µL d'une solution de violet de cristal (0,4 %) et laissé à température ambiante pendant 30 minutes. Les puits ont été rincés cinq fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer l'excès de colorant. Enfin, 200 µL d'éthanol à 95 % ont été ajoutés à chaque puits pour solubiliser le cristal violet fixé aux cellules adhérentes.

La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par l'équation (9) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition\%} = \frac{\text{DO control négatif} - \text{DO échantillon traité}}{\text{DO control négatif}} \times 100 \dots \dots \dots (9)$$

I.7.6. Observation de l'inhibition du biofilm par microscopie optique

L'inhibition de la formation de biofilm a été évaluée à l'aide de la méthode d'observation par microscope optique décrite par Lakshmi et *al.*(2020). Des lames de verre stérilisées ont été placées dans des plaques à 24 puits contenant les souches de *S. aureus* avec différentes concentrations des HEs, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, les lames en verre ont été nettoyées et colorées avec 0,4 % de violet de cristal, les lames colorées ont été examinées à l'aide d'un microscope optique à un grossissement de 400x.

I.8. Etude *in Silico*

I.8.1. Interactions composés-cibles (STITCH-STRING)

Pour but d'étudier l'interaction entre les molécules et les protéines bactérienne, une étude *in silico* a été effectuée. Pour trouver les protéines cibles, la recherche a été d'abord effectuée via la base de données Stitch (<http://stitch.embl.de/>).

L'étape suivante consiste à utiliser les protéines cibles directes obtenues pour rechercher la protéine cible indirecte via la base de données String (<https://string-db.org/>).

I.8.2. Le docking moléculaire

Le docking moléculaire est une méthode *in silico* utilisée en conception et découverte de médicaments. Elle permet de modéliser, au niveau atomique, l'interaction entre deux molécules: un ligand (petite molécule) et une protéine réceptrice, le plus souvent une enzyme (Fig. 19). Cette approche permet d'analyser le comportement des ligands dans le site de liaison des protéines cibles et de mieux comprendre les processus biochimiques fondamentaux (McConkey et *al.*, 2002).

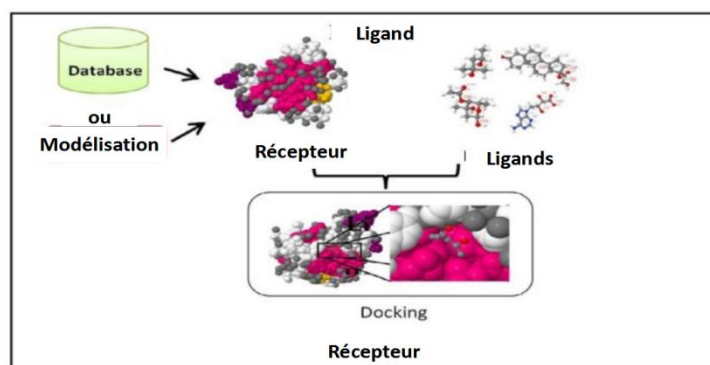


Figure 19: Principe du docking moléculaire

L'analyse d'amarrage moléculaire a été réalisée pour évaluer l'activité anti-quorum des deux HEs de *S. molle* et d' *E. globulus* contre les souches pathogènes de *S. aureus*. Le fichier pdb de l'opéron AgrA a été choisi comme cible en raison de son rôle essentiel dans la pathogénèse de *S. aureus*. Le fichier pdb d'AgrA (code PDB : 4G4K, résolution 1,52 Å) a été obtenu auprès de la Protein Data Bank (www.rcsb.org), tandis que tous les fichiers de ligands ont été récupérés en ligne (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Gherdaoui et al., 2024). Le fichier pdb de l'opéron AgrA a été transformé en version pdbqt à l'aide des outils de criblage virtuel AutoDock.

Toutes les molécules de ligand et de l'eau ont été détachées, à l'exception celles situées dans la poche active du récepteur. Les atomes d'hydrogène ont été incorporés avant de définir le site vigoureux du récepteur. De plus, l'état de protonation des résidus du site actif et les orientations des chaînes latérales a été ajusté, suivis d'une minimisation de l'énergie pour optimiser la structure.

Les fichiers pdb des ligands ont également été transformés au format pdbqt. Les tests d'amarrage ont été réalisés avec une liaison de ligand flexible et des récepteurs rigides à l'aide d'AutoDock Vina (Zellagui et al., 2024). Les résultats d'amarrage ont été évalués afin de déterminer les meilleures positions de liaison ; les énergies d'interaction et les interactions clés avec les sites actifs d'AgrA. Les meilleures positions ont été sélectionnées du point de vue de la liaison et de leurs interactions avec les enzymes.

Grâce au logiciel Discovery Studio, il a été possible d'interpréter le mécanisme de liaison et de rechercher des composés potentiels des HEs de *S. molle* et de *E. globulus* (Zellagui et al., 2024).

I.8.3. Prédiction ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité)

L'ADMET a été utilisé afin d'étudier la pharmacocinétique des composants des HEs de *S. molle* et *E. globulus*. Les données SMILES des composés sélectionnés ont été collectées à partir de PubChem. L'ADMET ont été collectées à l'aide d'outils logiciels : le serveur de base de données SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>, consulté le 17 avril 2025) et un serveur de base de données ProTox-II (<http://tox.charite.de/tox/>, consulté le 17 avril 2025) (Kadri et *al.*, 2020; Othman et *al.*, 2020).

I.9. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicata sur des jours séparés, et les résultats ont été présentés sous forme de moyennes avec écarts-types. Le logiciel SPSS a été utilisé pour l'analyse statistique, notamment une ANOVA à deux facteurs suivis de tests post-hoc de Tukey. Les résultats ont été considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

Chapitre II
Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*

L'isolement et l'identification de la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*, réalisés au laboratoire, ont permis de mettre en évidence que, sur les 60 échantillons analysés, 16 présentaient une croissance bactérienne positive sur gélose Chapman, caractéristique du genre *Staphylococcus*, tandis que 44 échantillons n'ont révélé aucune croissance typique. Parmi les 16 isolats obtenus, six ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *S. aureus*.

II.1.1. Pré identification de *Staphylococcus aureus*

Après 24 heures d'incubation, des colonies présentant les caractéristiques *S. aureus* ont été observées sur le milieu de culture sélectif Chapman. Les isolats S1, S2, S3, S4, S5, S6 ont montré des aspects morphologies macroscopiques similaires, produisant de petites colonies rondes, crémeuses, de couleur jaune-doré (Fig. 20), conformément aux descriptions rapportées par Zadik et al. (2001).

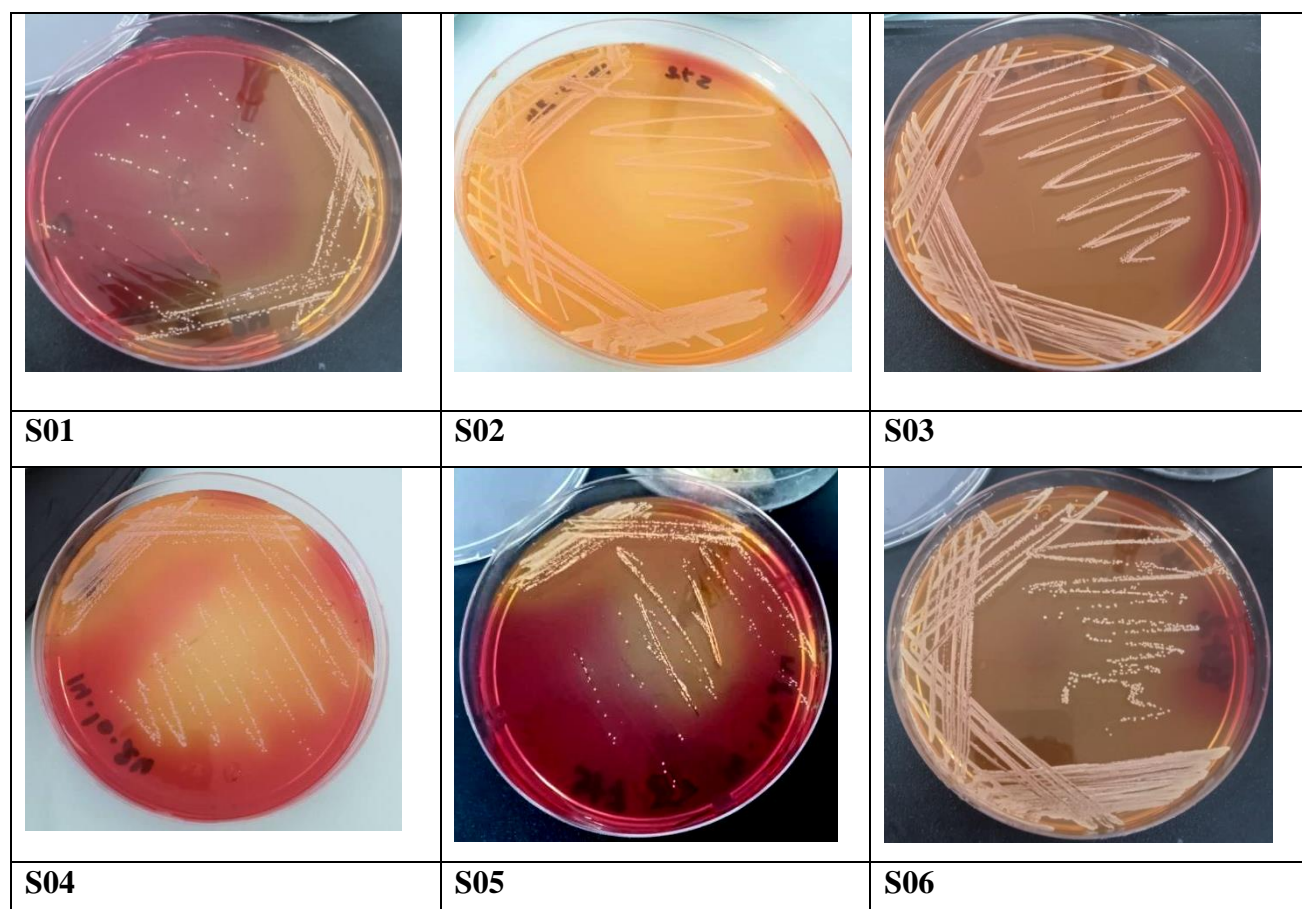


Figure20 : La croissance de *S. aureus* sur milieu Chapman.

L'analyse microscopique des souches purifiées a révélé la présence de coques à Gram positif regroupés en grappe (Fig. 21). Ces observations sont typiques de *S. aureus*, bactérie à Gram positif reconnue pour sa morphologie particulière et sa tendance à former de tels arrangements cellulaires en grappe (Gnanamani et al., 2017).

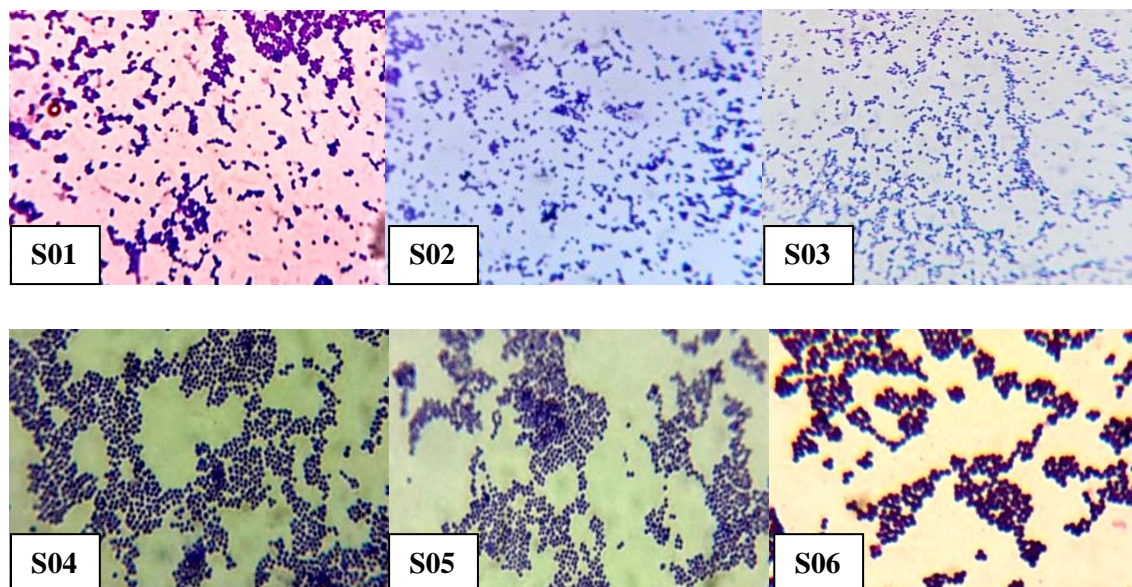


Figure 21: Observation microscopique des isolats de *Staphylococcus aureus* après la coloration de Gram.

II.1.3. Identification biochimique

Afin de confirmer les observations macroscopiques et microscopiques, les six isolats ont été soumis à des tests biochimiques de référence tels que la catalase, la coagulase et l'ADNase.

Le test de la catalase a révélé une apparition de bulles d'oxygène après l'ajout de 3 % de peroxyde d'hydrogène, confirmant la capacité des isolats de *S. aureus* à produire l'enzyme catalase, responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. L'ensemble des isolats testés a présenté une réaction positive.

Concernant le test de la coagulase, après 24 heures d'incubation, les six isolats ont présenté la formation des caillots persistants au fond des tubes à essai stériles. Ce résultat confirme que ces isolats ne produisent pas l'enzyme fibrinolyse, dont l'activité fibrinolytique conduit normalement à la lyse du caillot.

Enfin, le test d'ADNase a révélé une activité enzymatique chez les 06 isolats, mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

L'ensemble des résultats biochimiques a permis de confirmer avec certitude l'identification des six isolats comme appartenant à l'espèce *S. aureus*.

Tableau 11 : Caractéristiques biochimiques des isolats de *S. aureus*

Espèce isolée	Gram	Catalase	Coagulasse	ADNase
S01	Cocci à Gram positif	+	+	+
S02	Cocci à Gram positif	+	+	+
S03	Cocci à Gram positif	+	+	+
S04	Cocci à Gram positif	+	+	+
S05	Cocci à Gram positif	+	+	+
S06	Cocci à Gram positif	+	+	+

II.1.4. Identification moléculaire

L'analyse phylogénétique des séquences partielles du gène 16S de l'ARNr obtenues pour les six isolats a confirmé leur appartenance au genre *Staphylococcus*. L'arbre phylogénétique, élaboré à l'aide du logiciel MEGA selon la méthode du Neighbor-Joining, illustre les relations évolutives entre les souches étudiées (Fig. 22, Tab. 12). Les six isolats (S01, S02, S03, S04, S05 et S06) se sont regroupés au sein du clade principal de *Staphylococcus aureus*, aux côtés des souches de référence AEW1 FF (MW175714.1) et AN3 FF (MW175716.1). L'isolat S04 s'est positionné en périphérie de ce clade, présentant une similarité plus étroite avec *S. roterodami* strain 25975, tout en restant inclus dans le groupe phylogénétique de *S. aureus*.

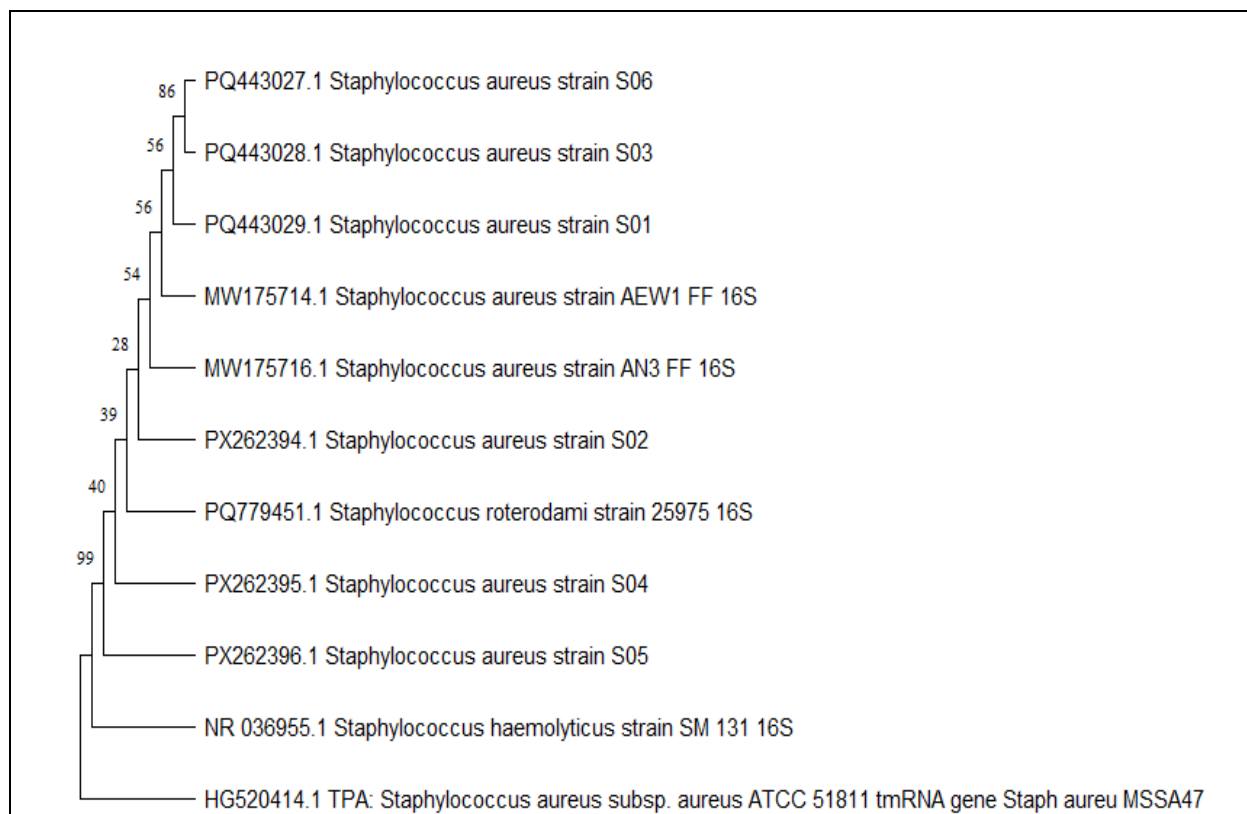


Figure 22 : Arbre phylogénétique mettant en évidence la position des souches de *S. aureus* par rapport aux autres souches typiques au sein des Staphylococcaceae généré par MEGA.

Le degré de similarité avec les séquences de référence était d'environ 96 %, confirmant l'identification moléculaire comme *S. aureus*. Les numéros d'accès GenBank des séquences déposées sont présentés dans le Tab.12.

Tableau 12. Identification moléculaire des souches isolées de *S. aureus*.

Les souches bactériennes	Numéro d'accès GenBank
S01	PQ443029
S02	PX262394
S03	PQ443028
S04	PX262395
S05	PX262396
S06	PQ443027

II.1.5. Evaluation de la sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques

Les profils de sensibilité des isolats de *S. aureus* à certains antibiotiques sont résumés dans le tab.13. L'évaluation de la susceptibilité des isolats aux antibiotiques a révélé des profils de résistance variables. Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des souches testées étaient totalement sensibles au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et à la norfloxacine (100%). Parallèlement, une résistance totale a été enregistrée à la Cefazoline. En revanche, les souches cliniques ont présenté une résistance accrue face à la Tétracycline et à l'Oxacillin. Par contre, nombreux isolats ont conservé une sensibilité notable à la rifampicine et la pristinamycine, excepté la souche clinique S01.

Tableau 13: Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques

Antibiotiques (ø mm)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	AgrA	AgrB	AgrC	MRSA	<i>S. aureus</i>
Chloramphenicol (C;30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacine (CIP; 5 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin(CN;10 µg)	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline(TE;30 µg)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Cotrimoxazole (COT;25µg)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Oxacillin (OX; 1 µg)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
Amikacin (AK; 30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Norfloxacine (NX ;10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefazolin (CZ;30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Rifampin (RA;5 µg)	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Pristinamycine (PT;15 µg)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

II.1.6. Capacité des souches à produire du slime

L'évaluation de la capacité des isolats de *S. aureus* à produire le slime a été réalisée sur le milieu rouge Congo Red Agar. Les résultats ont montré que les six isolats développaient des colonies de couleur noires sur ce milieu, indiquant leur aptitude à produire du slime (Fig. 23). Ces observations concordent avec plusieurs études antérieures, rapportant que plus de 50 % des isolats de *S. aureus*, issus de différentes infections cliniques, se révèlent positifs pour la production de slime. Cette capacité à produire du slime constitue un facteur déterminant dans la formation de biofilms, conférant à *S. aureus* une meilleure adhérence aux surfaces biotiques et abiotiques ainsi qu'une résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux défenses immunitaires de l'hôte (Zmantar et al., 2010; Szczuka et al., 2013; Nourbakhsh et al., 2016; Merghni et al., 2018).

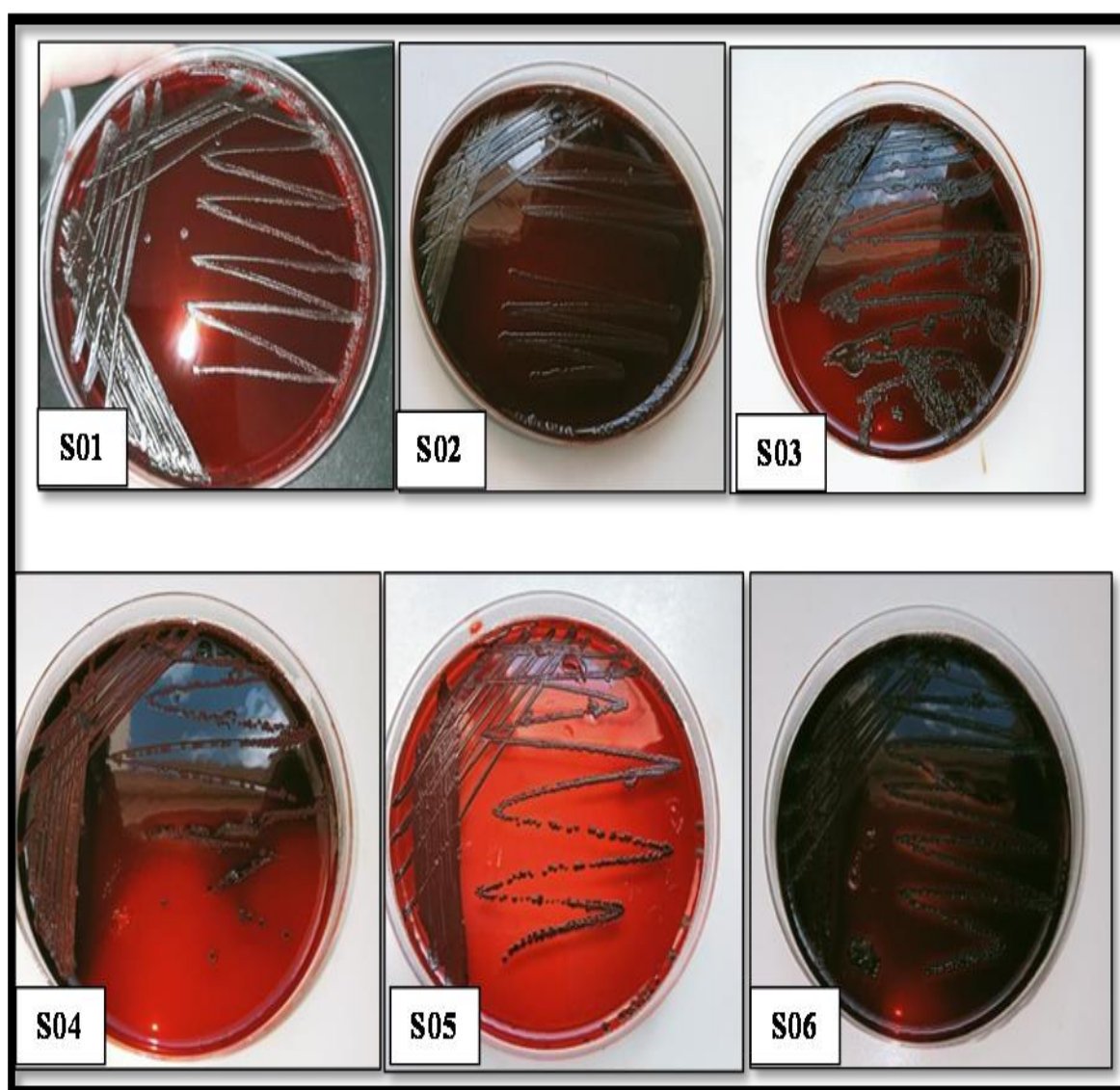


Figure23 : Production de slime sur le milieu rouge Congo (CRA)

II.1.7. Capacité des souches à la production du biofilm

La capacité des souches à produire des biofilms annulaires a été évaluée par leur culture dans des tubes à essai en verre. Un résultat positif a été confirmé par l'observation d'un anneau adhérent à la paroi interne du tube indiquant la formation d'un biofilm (Fig. 24).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Merghni *et al.* (2018), qui ont rapporté que 50 % des isolats de *S. aureus* présentaient une forte adhérence aux surfaces en verre, et que 14,3 % étaient fortement positifs pour la formation de biofilm sur des plaques de polystyrène. La majorité des infections cliniques causées par *S. aureus* sont en effet étroitement associées à sa capacité à former du biofilm. L'un des caractères particuliers de ces structures réside dans la résistance accrue aux antibiotiques et aux désinfectants, comparativement aux cellules homologues libres (Sandasi *et al.*, 2010).

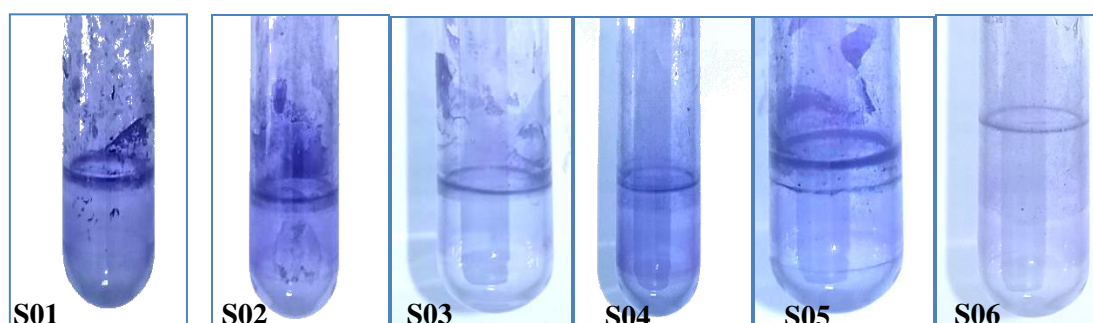


Figure 24 : Le phénotype du biofilm annulaire formé par les souches de *S. aureus* et coloré au cristal violet dans les tubes en verre.

2. Plantes médicinales

II.2.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles (HEs)

Les résultats des rendements d'extraction des huiles essentielles obtenues au niveau des feuilles de *Schinus molle* L. et d'*Eucalyptus globulus* L. sont regroupés dans le tableau 14.

Les feuilles de *S. molle* ont donné une huile essentielle d'aspect jaune pâle et dégageant un arôme légèrement piquant, avec un rendement de $0,71 \pm 0,01$ % (Fig. 25a). Ces résultats concordent avec ceux de Hamdan *et al.* (2016) et Machado *et al.* (2019) qui ont obtenu des rendements de 0,78 et 1%, respectivement. Par contre, les résultats obtenus par Abderrahim *et al.* (2018) ont révélé un rendement variant entre 0,1 et 3,0 %.

L'extraction des feuilles d'*E. globulus* a donné une huile essentielle d'aspect liquide, de couleur jaunâtre et dégageant une odeur agréable, avec un rendement de 1,87% (Fig. 25b). Ces résultats sont globalement similaires à ceux obtenus par Atmani-Merabet *et al.* (2018) et Puca *et al.* (2024), qui ont obtenu des rendements de 1,28 % et 0,96%, respectivement. Cependant, le rendement observé dans la présente étude demeure nettement supérieur à ceux rapportés par Boukhatem *et al.* (2014) et Belkhodja *et al.* (2021) qui étaient de 0,2% et 0,41 %, respectivement.

Tableau 14: Rendement d'extraction et propriétés sensorielles des huiles essentielles

	<i>S. molle</i>	<i>E. globulus</i>
Rendement	0,71 ± 0.01	1,87± 0.02
Couleur	Jaune pâle	Jaunâtre
Arome	Légèrement piquant	Odeur agréable
Aspect	Liquide	Liquide

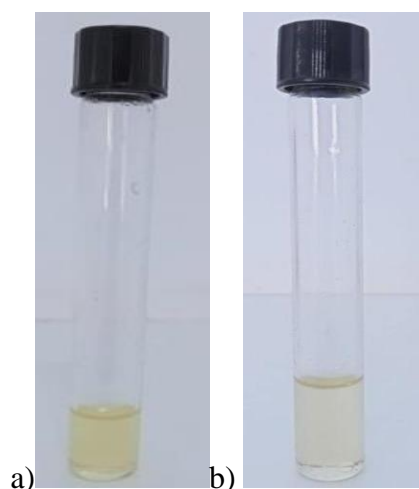


Figure 25 : L'huile essentielle: a) *Schinus molle*, b) d'*Eucalyptus globulus*

Les différences observées dans les rendements des huiles essentielles des deux plantes et selon les études antérieures peuvent être expliquées par la variabilité des caractéristiques de la plante, des parties récoltées, du stade phénologique des feuilles, des conditions environnementales (température, ensoleillement, humidité, nature du sol), ainsi que par les paramètres techniques de séchage et des procédés d'extraction utilisés (Duletić-Laušević *et al.*, 2019, Boukraâ *et al.*, 2021).

II.2.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées

La détermination des propriétés physico-chimique est essentielle pour évaluer leurs qualités et leurs applications biologiques.

Tableau 15: Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées.

	<i>S. molle</i>	Valeurs standards	<i>E. globulus</i>	Valeurs standards
Densité	0,901±0,005	0,872 - 0,931	0,910± 0,002	0,905-0,921
Indice de réfraction	1,479±0,007	1,476 - 1,484	1,471± 0,004	1,460-1,476
Pouvoir rotatoire	+7,25°	/	+5,01 ±0,001	+0° à +10°
pH	5,2±0,01	4,489 – 5,315	4,9±0,01	4-6
Indice d'acide	1,991	1,958 – 2,938	3,20±0,05	0,84-3,74
Indice d'ester	6,318	5,398 – 10,656	182,01	/

La densité de l'HE de *S. molle* a été estimée à 0,901±0,005. Cette valeur est en accord avec celles rapportées par Plaza *et al.* (2015) et Zerrouk *et al.* (2018), qui étaient comprises entre 0,890 et 0,950 et entre 0,872 et 0,931. En ce qui concerne l'HE d'*E. globulus*, la valeur de la densité enregistrée était de 0,9098 ± 0,002. Cette valeur concorde avec les normes de référence (0,905 à 0,921) et avec les résultats obtenus par Ben Hassine *et al.* (2012). Par contre, cette valeur est supérieure à celle obtenue par Belkhodja *et al.* (2021) qui était de (0,632) (Tab15).

L'indice de réfraction de l'HE de *S. molle* était déterminé à 1,479±0,007, cette valeur est conforme aux normes AFNOR et légèrement inférieure à celle obtenue par Zerrouk *et al.* (2018) qui variaient entre 1,4982 et 1,5189. L'indice de réfraction de l'HE d'*E. globulus* était déterminé à 1,470 ± 0.004, ces valeurs sont en accord avec les normes d'AFNOR (1,460 - 1,476). En revanche, cette valeur demeure légèrement inférieure à celle obtenue par Mendes Silva *et al.* (2011) et Kassahun *et al.* (2019) qui étaient de 1,458 et 1,451 (Tab 15).

Le pouvoir rotatoire de l'HE de *S. molle et d'E. globulus* était de +7,25° et +5,01° ± 0,001, respectivement. Ce qui convient à la norme AFNOR qui exige un pouvoir rotatoire entre +0° à +10°.

La détermination du pH a donné une valeur de (5,2 et 4,9) pour *S. molle* et *E. globulus*, respectivement. Ces valeurs sont conformes aux normes AFNOR dont le pH est de 4 à 6 pour les huiles essentielles.

L'indice d'acidité représente la quantité d'acides gras libres résultant des réactions d'hydrolyse des triglycérides. Il est considéré comme un critère de qualité permettant de rendre compte de la conservation des huiles essentielles. Les résultats obtenus de l'indice d'acidité étaient de 1,991 et 3,20 pour *S. molle* et d'*E. globulus*, respectivement. Ces résultats sont conformes aux normes AFNOR (Tab 15). Une huile essentielle de bonne qualité doit avoir une acidité faible (Bourachouche et al., 2017).

La bonne qualité de l'huile essentielle se détermine aussi par l'indice d'ester. Plus l'indice d'ester est élevé, la qualité d'une HE est meilleure (Dumortier, 2006). Les huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* révèlent un indice d'ester de 6,318 et 182,01, respectivement. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Belkhodja et al. (2022) qui ont enregistré une valeur d'ester chez *E. globulus* de 196,35.

Les variations observées dans les paramètres physico chimiques des huiles essentielles peuvent être attribuées à des différences de composition chimique, notamment à la proportion relative de monoterpènes, de composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones) et d'hydrocarbures terpéniques, ainsi qu'à l'influence des conditions écophysiologiques et des paramètres d'extraction sur la concentration et la nature des métabolites volatils (Kumar, 2022).

II.2.3. Caractérisation phytochimiques des huiles essentielles

Afin de compléter la caractérisation physico-chimique des huiles essentielles étudiées, l'analyse de la composition chimique par la spectroscopie FTIR et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont été réalisées dans le but d'identifier les principaux constituants responsables de leurs propriétés biologiques.

II.2.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Plusieurs chercheurs ont démontré l'efficacité de la spectroscopie FTIR pour identifier et quantifier les principaux groupes fonctionnels et composés des huiles essentielles (Bounaas et al., 2018; Raeber et al., 2023).

II.2.3.1.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des HE de *S. molle*

L'analyse du spectre FTIR de l'HE de *S. molle* (Fig. 26) a révélé des bandes d'absorption distinctes correspondant à ses principaux composants. L'analyse FTIR concorde avec ces études, identifiant des bandes d'absorption distinctes correspondant à des composants majeurs.

La large bande observée entre 3300 et 3500 cm^{-1} indique des vibrations d'étirement O–H, caractéristiques des groupes hydroxyles. Cette bande suggère la présence d'alcools tels que le linalol et de composés phénoliques comme l'eugénol.

Des pics marqués autour de 2900 cm^{-1} correspondent à des vibrations d'étirement C–H, généralement associées aux chaînes aliphatiques présentes dans les terpènes. Ces vibrations suggèrent la présence de composés tels que l' α -pinène et le β -pinène, qui contiennent des groupes méthyle ($-\text{CH}_3$) et méthylène ($-\text{CH}_2-$). Ces résultats s'alignent avec l'étude menée par Lopez et *al.*, (2018), qui ont identifié des bandes d'absorption distinctes présentes autour de 2800 - 2900 cm^{-1} en raison de l'étirement C–H.

Un pic distinct autour de 1700 cm^{-1} correspond aux vibrations d'étirement C=O, révélatrices de groupes carbonyles. Cette caractéristique suggère la présence de cétones ou d'aldéhydes, tels que la carvone ou le citral.

Dans la bande 1500–1600 cm^{-1} , les pics associés aux vibrations d'étirement C=C indiquent la présence de cycles aromatiques ou d'alcènes, typiques de composés comme le limonène ou le myrcène. Enfin, la région de l'empreinte digitale (1000–1500 cm^{-1}) présente plusieurs pics correspondant aux vibrations d'étirement C–O et de flexion C–H, souvent présentes dans les terpénoïdes et autres composés oxygénés. Cette région inclut probablement des contributions du cinéole et du terpinéol. Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Luque et *al.* (2016) et Lopez et *al.* (2018) qui ont observé une bande à 1750 cm^{-1} liée au groupe carbonyle C=O présent dans certaines molécules de terpènes des constituants des huiles essentielles.

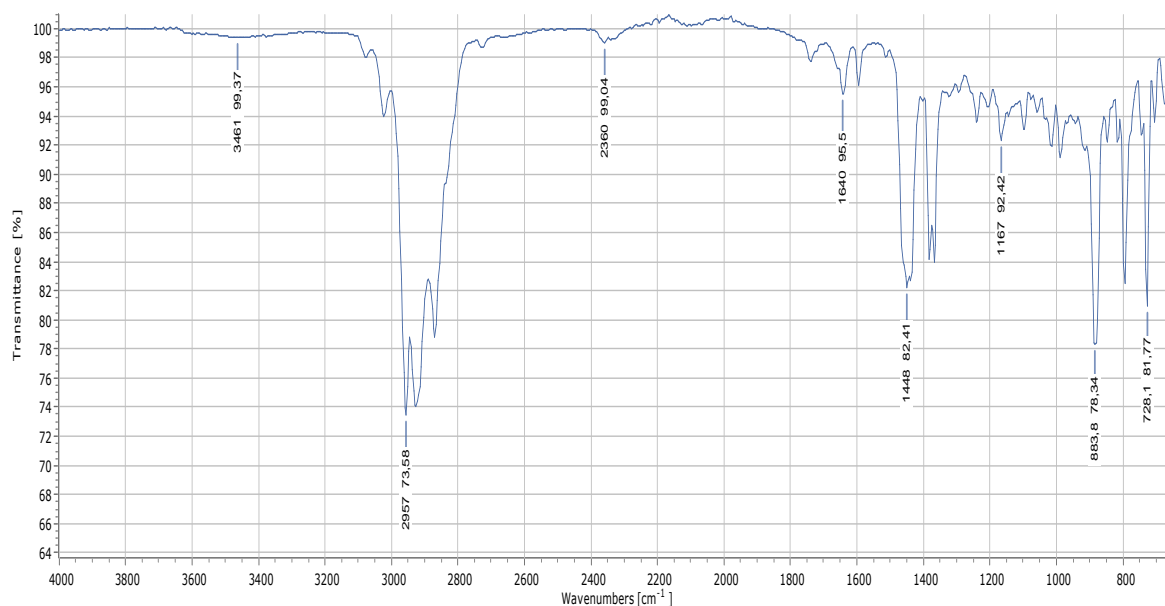


Figure 26: Analyse FTIR de l'huile essentielle de *Schinus molle*.

II.2.3.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de l'HE d'*E. globulus*

Le spectre FTIR de l'HE d'*E. globulus* a enregistré entre la plage 4 000 à 500 cm^{-1} , indiquant des bandes d'absorption caractéristiques compatibles à des groupes fonctionnels détectés généralement dans les huiles essentielles (Fig 27).

Un large pic a été détecté à 3461 cm^{-1} , attribué aux vibrations d'étirement des groupes hydroxyles (O-H), indiquant la présence d'alcools ou de phénols. Cette bande suggère la présence de monoterpènes oxygénés, tels que le 1,8-cinéole (eucalyptol), qui est le composant majeur de l'HE d'*E. globulus* et contribuant à ses propriétés antimicrobiennes.

Les deux pics autour de 2922 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'étirement asymétriques et symétriques des liaisons C-H dans les groupements aliphatiques (CH_2 et CH_3). Ces signaux sont caractéristiques des hydrocarbures, en particulier des squelettes terpénoïdes (monoterpènes et sesquiterpènes) qui se trouvent couramment dans les huiles essentielles, jouant un rôle crucial dans les propriétés aromatiques et volatiles de l'huile.

Le pic 1681 cm^{-1} est associé aux vibrations d'étirement des groupes carbonyle (C=O), ce qui pourrait indiquer la présence de cétones ou d'aldéhydes. Des composés tels que la pipéritone ou d'autres terpénoïdes contenant du carbonyle peuvent contribuer à ce signal. La présence de ces groupes fonctionnels contribue à la bioactivité antifongiques et

antibactériennes potentielles des huiles essentielles. Le pic 1375 cm^{-1} provient des vibrations de flexion (déformation) des groupes méthyles (CH_3), courantes dans de nombreux monoterpènes et sesquiterpènes. Cette bande supporte également la présence de terpénoïdes ramifiés ou cycliques.

Les pics complexes entre $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$ sont attribués aux vibrations d'étirement C-O et de flexion C-H. Ces signaux sont les caractéristiques des alcools, des éthers et des esters, confirmant davantage la présence de terpènes oxygénés tels que le 1,8-cinéole et d'autres constituants mineurs comme les dérivés ou les esters de terpinène. Ces composés sont essentiels aux propriétés fonctionnelles de l'huile, notamment aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

Les pics dans la région $1000 - 650\text{ cm}^{-1}$ correspondent à des vibrations de flexion hors plan des liaisons C-H dans les composés aromatiques et aliphatiques, suggérant la présence de composés terpénoïdes aromatiques ou cycliques. Ceux-ci contribuent à la complexité structurale et aux effets synergétiques potentiels des composants de l'huile essentielle. Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs recherches telles que Schulz et *al.* (2005), Sharma et *al.* (2021) et Dzimitrowicz et *al.*, (2021) qui ont révélé la présence de 1,8-cinéole par l'analyse FTIR.

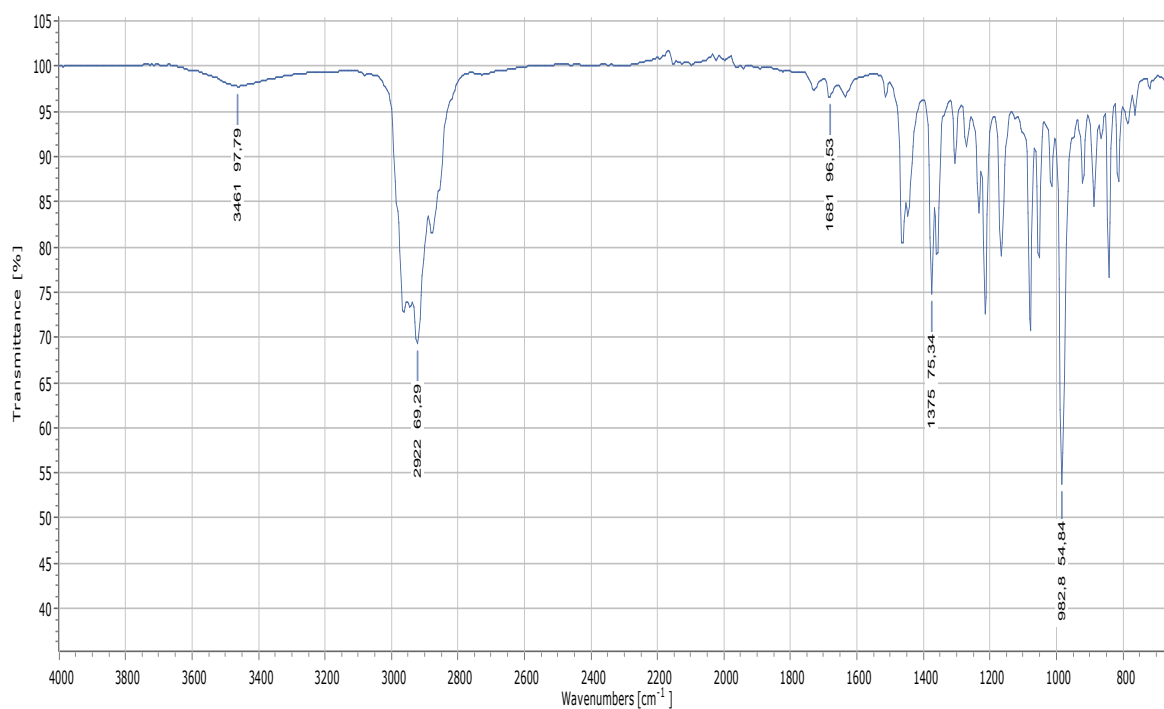


Figure 27: Analyse FTIR de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus.

II.2.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse (GC-MS)

II.2.3.2.1. *Schinus molle* L.

La détermination de la composition chimique de l'HE de *S. molle* a révélé la présence de 20 composants. Parmi ceux-ci, les hydrocarbures monoterpènes figuraient le groupe prédominant avec 80,07%, suivi des hydrocarbures de sesquiterpènes avec 15,12% et des terpénoïdes avec 2,78%. L'HE de *S. molle* a été particulièrement caractérisé par la présence élevée de limonène (35,82%) comme composant majeur, suivie par α -phellandrene (19,13%), β -Myrcene (9,07%), o-cymene (7,93%), et le α -pinene (7,88%) (Tab 16).

Tableau 16: Composition chimique de l'huile essentielle de *S. molle*

Pic	aRT (min)	bRI (nist)	cRI (exp.)	d (%)	Composants	Classe
1	10,55	937	932	7,88	α -Pinene	Monoterpenes
2	12,21	974	972	0,27	Sabinene	
3	12,97	991	988	9,07	β -Myrcene	
4	13,58	1005	999	19,13	α -Phellandrene	
5	14,48	1022	1022	7,93	o-Cymene	
6	14,72	1030	1028	35,82	Limonene	
7	30,95	1391	1389	0,77	β -Elemene	Sesquiterpenes
8	31,70	1409	1407	0,53	α -Gurjunene	
9	32,10	1419	1418	0,61	Caryophyllene	
10	33,46	1454	1453	1,32	Humulene	
11	34,52	1477	1480	3,00	γ -Muurolene	
12	35,08	1495	1494	0,67	β -Cyclogermacrane	
13	35,20	1499	1497	0,97	α -Muurolene	
14	35,70	1513	1512	0,29	γ -Cadinene	
15	36,03	1524	1522	3,00	δ -Cadinene	
16	36,94	1549	1549	1,71	Elemol	
17	37,83	1598	1576	1,59	β -copaene	
18	39,93	1645	1643	0,86	α -ylangene	
19	40,33	1727	1656	1,07	Guaiol acetate	Terpenoid Esters
20	41,46	1805	1692	3,04	Tau-Cadinol acetate	

Ces résultats sont similaires avec ceux obtenues par Rey-Valeirón (2017) et Belousesaine et *al.* (2022) qui ont démontré que le principal composant est le limonène (22,94% et 19,5%), respectivement.

En revanche, l'étude de l'huile essentielle extraite des feuilles de *S. molle* récoltées dans la région de Mascara, en Algérie par Lalia et *al.* (2023), a mis en évidence la présence de shyobunone (10,14%), du 1-phellandrene (9,63%), de l' α -cadinol (7,46%), du Δ -cadinène (7,45%), et de Germacrene D (7,09%) comme principaux composants.

Cependant, l'HE extraite des feuilles de *S. molle* récoltées en Egypte ont enregistré le α -phellandrene (29,9%); β -phellandrene (21,1%) comme composants majeurs (Gad et *al.*, 2022). Egalement, une autre étude menée en Egypte a montré que l' α -phellandrene (29,8%) et le β -phellandrene (21,1%) comme composants majeurs (Hussein et *al.*, 2021). De même, les principaux constituants de *S. molle* collectés en Turquie ont été identifiés comme étant, respectivement, l' α -phellandrene, le limonène, le β -phellandrene et le p-cymène (Eryigit et *al.*, 2017).

Les variations chimiques observées dans la composition de l'HE pourraient être attribués à plusieurs facteurs, notamment les techniques d'extraction utilisées, les conditions environnementales, géographiques et locales, ainsi que les variations génétiques entre les différentes espèces végétales (Barra et *al.*, 2009).

II.2.3.2.2. *Eucalyptus globulus* L.

L'analyse GC-MS a mis en évidence une variabilité considérable dans la composition chimique de l'HE d'*E. globulus*, avec un total de 15 composés identifiés. Parmi ceux-ci, les hydrocarbures monoterpéniques étaient le groupe prédominant, représentant 91,43%, suivis des hydrocarbures sesquiterpéniques à 6,34 % (tableau 17). L'huile essentielle d'*E. globulus* est particulièrement caractérisée par la forte présence de l'eucalyptol (36,78 %) comme composant majeur, suivi de l'*o*-cymène (26,85 %). D'autres composants notables comprenaient γ -terpinène (14,93%), α -pinène (7,78 %), limonène (4,36 %), β -cyclogermacrane (3,42 %), germacrene B (1,30 %).

Tableau 17: Composition chimique de l'huile essentielle d'*E. globulus*

Pic	aRT (min)	bRI (Nist)	cRI (Exp.)	%	Composants	Classe
1	10,54	929	932	7,78	α -Pinene	Monoterpene Hydrocarbons
2	12,96	979	987	0,19	β -Pinene	Monoterpene Hydrocarbons
3	14,48	1022	1022	26,85	O-Cymene	Monoterpene Hydrocarbons
4	14,66	1030	1026	4,36	Limonene	Monoterpene Hydrocarbons
5	14,86	1032	1031	36,78	Eucalyptol	Monoterpene Hydrocarbons
6	16,03	1060	1057	14,93	γ -Terpinene	Monoterpene Hydrocarbons
7	17,39	1088	1085	0,54	Terpinolene	Monoterpene Hydrocarbons
8	21,54	1177	1176	0,59	4-Terpineol	Monoterpene Oxygenated
9	32,89	1440	1438	1,03	Aromandendrene	Sesquiterpene Hydrocarbons
10	33,74	1461	1461	0,59	Alloaromadendrene	Sesquiterpene Hydrocarbons
11	35,09	1495	1494	3,42	β -Cyclogermacrane	Sesquiterpene Hydrocarbons
12	37,92	1536	1578	1,30	Germacrene B	Sesquiterpene Hydrocarbons
13	38,13	1561	1584	1,25	1(10),11- Eremophiladien-9-ol	Sesquiterpenes Oxygenated
14	42,71	1675	1738	0,37	Ylangenal	Oxygenated Sesquiterpenes

Plusieurs études antérieures ont montré que le composé principal chez les espèces d'*Eucalyptus* est le 1,8-cinéole, indépendamment du lieu de culture (Tyagi et al., 2011 ; Cai et al., 2020 ; Almas et al., 2021). Nos résultats corroborent avec ceux d'El Orche et al. (2024) qui rapportent que l'HE d'*E. globulus* provenant du Maroc contient des concentrations plus élevées de 1,8-cinéole. Nos résultats concordent également avec ceux de Ait-Ouazzou et al. (2011), Luís et al. (2015), Harkat-Madouri et al. (2015), Atmani-Merabet et al. (2018), Ait

Benlabchir *et al.* (2024) et Batista *et al.* (2024), confirmant ainsi l'abondance de ces composés dans l'HE *E. globulus*.

D'autre part, nos résultats diffèrent de ceux rapportés par Bourakna *et al.* (2022), qui ont signalé que le spathulenol (32,66%) est le composant majeur d'HE *E. globulus*, récolté de la wilaya de Mascara. D'autres travaux sur *E. globulus* tels que ceux de Rekioua *et al.* (2022) ont démontré que l'aromandendrène représente (14,48 %), le ledol (12,24 %), l'eucalyptol (10,46 %), α -terpinylacétate (5,82 %). Cmiková *et al.* (2023) ont indiqué la présence de p-cimène à (7,7%), d' α -8 pinène (7,3%), d' α -limonène (6,9%), d' γ -terpinène (3,6%), de β -pinène (3,0%) et de β -myrcène (1,7%).

Salem *et al.* (2018) ont étudié la composition de l'HE en fonction du stade de développement de la plante. Ils ont démontré que le 1,8-cinéole était le composé majoritaire aux stades végétatifs et en pleine floraison (32,19 %), tandis que le p-cymène devenait le composé dominant au stade de fructification avec (37,82 %).

Des études antérieures ont documenté l'impact de l'origine géographique et de la variété des espèces sur les divergences observées dans la composition chimique de l'HE d'HE *E. globulus* (Orche *et al.*, 2024). De même, Barbosa *et al.* (2016) et Shiferaw *et al.* (2019) ont rapporté que la concentration des principaux composants, comme le 1,8-cinéole, l'alpha-pinène et le limonène, varie considérablement selon les différentes espèces d'eucalyptus et les emplacements géographiques.

3. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HEs)

II.3.1. Étude de l'activité antibactérienne de l'HE de *S. molle*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *S. molle* contre les souches cliniques et mutantes de *S. aureus* ont révélé un effet inhibiteur significatif très variable en fonction des souches testées de *S. aureus*, spécialement entre 50 et 200 mg/mL ($p < 0,01$). Le diméthyl-sulfoxyde (DMSO 10%), utilisé comme témoin négatif n'a montré aucune activité antibactérienne contre *S. aureus*. Les souches les plus sensibles, S03, AgrB, S02 et AgrA ont présenté des activités les plus notables avec des zones d'inhibition allant de 27 à 34,33mm, respectivement, particulièrement lorsqu'elles ont été traitées avec la dose 200 mg/mL d'HE de *S. molle* (Fig 28)..

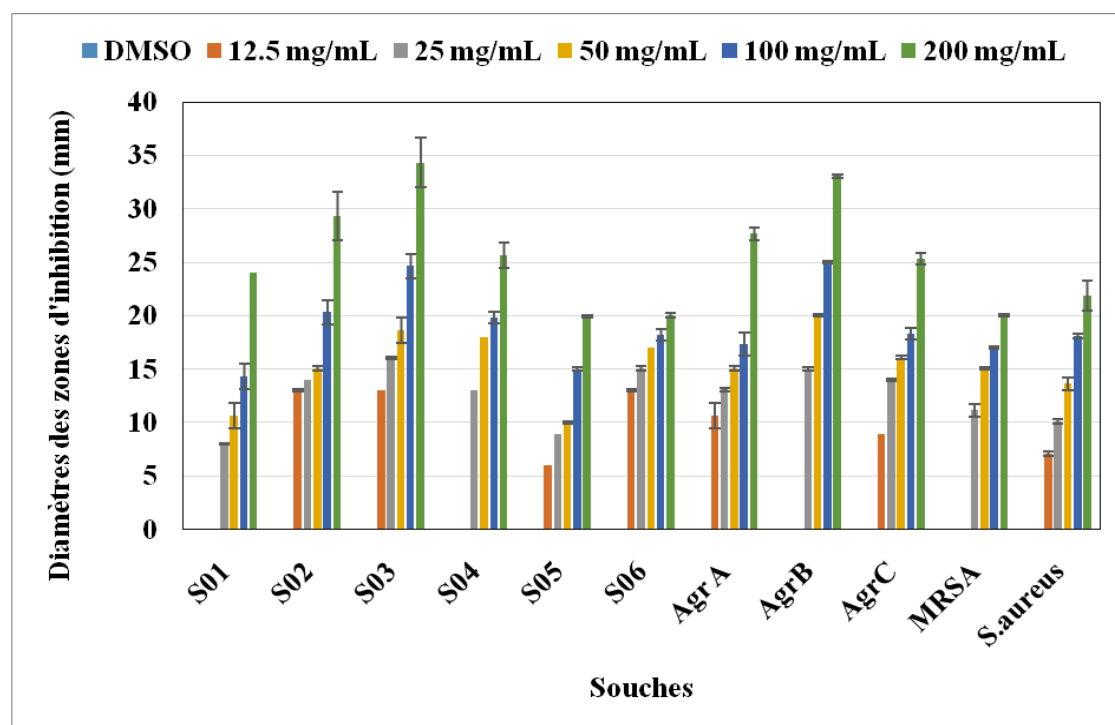


Figure28: Diamètre d'inhibition par diffusion en milieu gélosé de l'HE de *S. molle* contre *S. aureus*

Ces résultats sont en accord avec ceux cités par Deveci et *al.* (2010) et Martins et *al.* (2014), qui ont également observé une activité antibactérienne notable contre les souches de *S. aureus* testées, y compris les souches résistantes à la méthicilline (SARM). Par ailleurs, Rouibi et *al.* (2010), Tadjeddine et *al.* (2021) ont démontré que les HEs des fruits et des feuilles de *S. molle* présentent une activité antibactérienne élevée contre *S. epidermidis* et *S. aureus*, avec des CMI respectives de 63 et 125 $\mu\text{g/ml}$ pour les feuilles, et de 125 et 500 $\mu\text{g/ml}$ pour les fruits. Des teneurs élevées en limonène et de cis-ocymène dans l'HE de *S. molle* ont été positivement associées à une forte activité antibactérienne contre les staphylocoques (Perigo et *al.*, 2016). De plus, Rocha et *al.* (2012) ont rapporté que cette huile exerce une activité inhibitrice contre *S. aureus* ATCC25923, suggérant un effet déterminant de certains composants tels que l' α -pinène, le β -pinène et le sabinène). La nature et la proportion des constituants des huiles essentielles déterminent en effet leur activité anti-staphylococcique ainsi que leur mode d'action. Dans la majorité des cas, ce sont les composés majoritaires qui sont responsables de l'activité antibactérienne observée (Marino et *al.* 2001).

II.3.1.2. Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing de *Schinus molle* L.

La capacité inhibitrice du QS de l'HE de *S. molle* a été évaluée à l'aide du test de diffusion sur disque en utilisant la bactérie modèle *Chromobacterium violaceum* (CECT 494). L'activité inhibitrice augmente progressivement à mesure que la concentration de l'huile essentielle est élevée, traduisant une relation dose-dépendante entre la quantité d'HE appliquée et la réponse biologique observée. À la concentration 200 mg/mL, les résultats ont indiqué que les halos d'inhibition du QS étaient significativement plus importants que ceux de l'inhibition de la croissance, avec respectivement $30,03 \pm 0,15$ mm et $15,1 \pm 0,1$ mm (Fig 29). Ces résultats démontrent que l'HE de *S. molle* exerce une action inhibitrice du QS nettement supérieure à son effet antibactérien.

Ces observations corroborent celles rapportées par Pellegrini et al. (2014), qui ont également mis en évidence une forte inhibition du QS lors de l'utilisation d'une huile essentielle concentrée *S. molle*, avec des halos de ($50 \pm 1,2$ et $24 \pm 0,8$ mm), respectivement. Par contre, les études menées par Adonizio et al. (2006) ont révélé que les extraits éthanoliques et aqueux de *S. molle* ne présentaient aucun effet inhibiteur sur le quorum sensing, ce qui nous conduit à suggérer que cette activité est étroitement liée à la fraction lipophile de la plante, particulièrement riche en composés volatils.

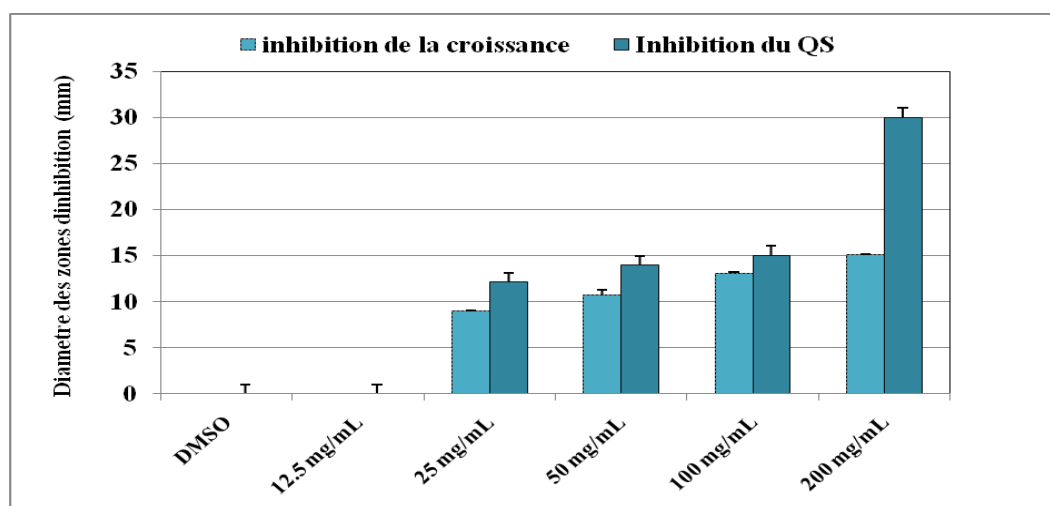


Figure 29 : L'effet anti quorum sensing de l'huile essentielle de *S. molle* contre *Chromobacterium violaceum* (CECT 494).

II.3.1.2.2. Inhibition de la violacéine

L'huile essentielle de *S. molle* a entraîné une réduction substantielle de la production de la violacéine, atteignant une diminution significative selon la concentration appliquée, atteignant jusqu'à 82 à 87% à la concentration 100 et 200 mg/mL (Fig 30). Cependant, aucune réduction notable n'a été observée à 12,5 mg/mL. Ces résultats observés sont cohérents avec ceux de Pellegrini et al. (2014), qui ont souligné l'efficacité vigoureuse de l'HE de *S.molle* à des concentrations plus élevées, entraînant une réduction de 50 % de la production de violacéine à un taux de 0,005 % d'HE. Parallèlement, Zaki (2013) a indiqué que les extraits éthanoliques de *S. molle* étaient inefficaces pour réduire la synthèse de violacéine par *C. violaceum*, soulignant toujours que que l'activité anti-QS est principalement associée aux composés volatils présents dans l'huile essentielle.

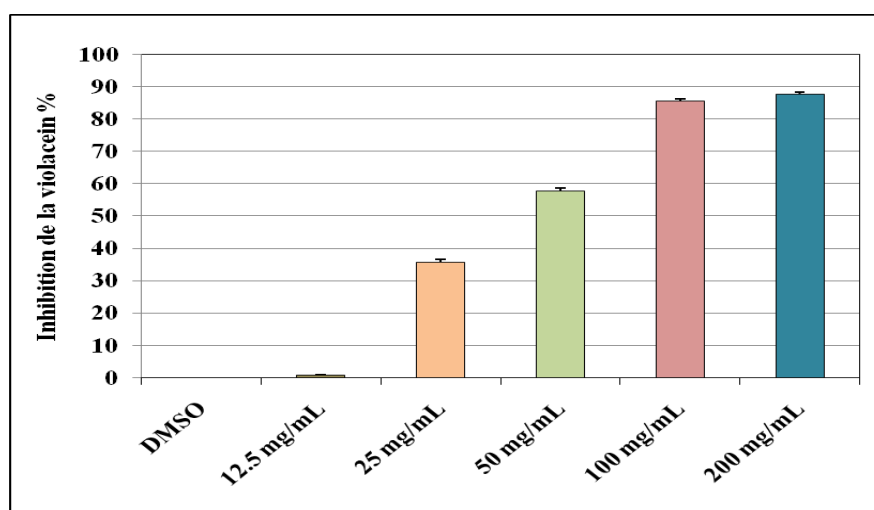


Figure 30 : L'effet de l'huile essentielle de *S.molle* sur la production de la violaceine.

II.3.1.3. L'activité antivirulence de l'huile essentielle de *S. molle*

II.3.1.3.1. Inhibition de Staphyloxanthin

Le test de l'effet de l'HE de *S. molle* sur la synthèse de staphyloxanthine a révélé une inhibition significative de sa production ($96,27 \pm 0,24$) ($p < 0,01$) (Fig31). La concentration de 200 mg/mL a présenté une réduction significative de la production pour la plupart des souches.

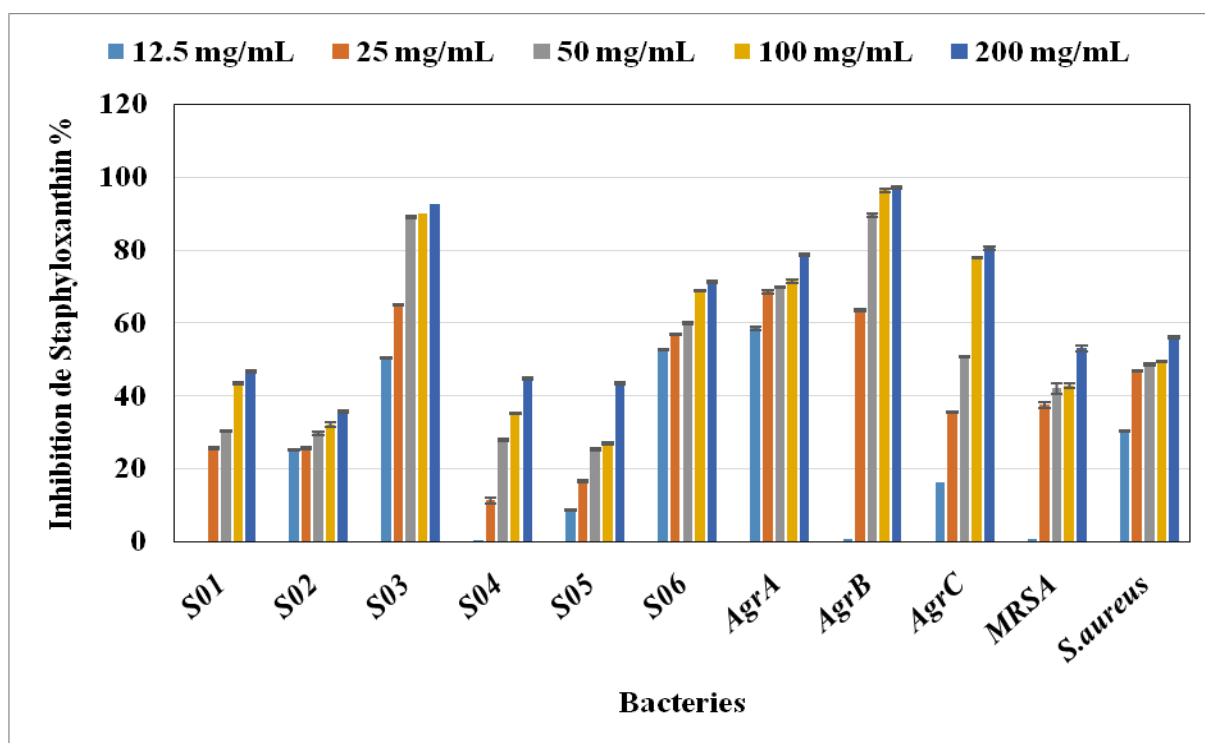


Figure31: Effet de l'huile essentielle de *S. molle* sur la production de staphyloxanthin chez les souches cliniques et mutantes de *S. aureus*

Une réduction significative des niveaux de staphyloxanthine a été observée chez les souches mutantes AgrA, AgrB et AgrC, ainsi que certaines souches testées, en réponse à l'augmentation des concentrations d'HE de *S. molle*, la souche AgrA se révélant la plus sensible. Des réductions variables de la production de staphyloxanthine ont également été observées dans les souches SARM et les souches testées de *S. aureus*. Parmi les souches testées, S01, S03 et S06 se sont montrées particulièrement les plus sensibles, présentant une réduction significative de la production de staphyloxanthine même à des concentrations modérées d'HE (50 mg/mL). Ces résultats corroborent avec ceux rapportés par Lima et al., (2019), qui ont observé que l'HE de *S. terebinthifolia* a induit une réduction de la production de staphyloxanthine chez *S. aureus* allant de 48,78 % à 82,88 % .

La réduction de la synthèse de staphyloxanthine observée chez les souches mutantes AgrA, AgrB et AgrC suggère que cette huile exerce un impact significatif sur le mécanisme du quorum sensing de *S. aureus*, qui régule l'expression des facteurs de virulence. Comme le soulignent Yamazaki et al., (2024), le système Agr constitue une voie QS cruciale chez *S. aureus*, orchestrant la régulation de divers attributs de virulence en fonction de la densité de population bactérienne.

II.3.1.3.2. Inhibition de Slime

Le tableau 18 regroupe les résultats de l'effet de l'HE de *S. molle* sur la formation de slime dans les souches isolées et mutantes de *S. aureus*. La production de slime est directement corrélée à l'intensité de la coloration noire entourant les colonies. L'absence de la coloration noire à des concentrations comprises entre 100 et 200 mg/mL pour les souches isolées et à 25 mg/mL pour les souches mutantes suggère que la production de slime a été efficacement inhibée. En revanche, à 12,5 mg/mL, aucune coloration noire n'a été observé, indiquant l'absence d'effet inhibiteur (Lee et *al.*, 2015). Ces observations confirment de manière concluante que l'HE de *S. molle* exerce une inhibition marquée sur la production de slime dans les souches testées de *S. aureus*.

Tableau 18: Effet de l'huile essentielle de *S. molle* sur la production de slime

Conc. (mg/mL)	S01	S02	S03	S04	S05	S06	AgrA	AgrB	AgrC	MRSA	<i>S.aureus</i>
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) Absence de la coloration noire autour des colonies ce qui signifie inhibition de la production du slime par l'huile essentielle de *S. molle*.

(+) Présence de la coloration noire autour des colonies ce qui signifie la non inhibition de la production de slime par l'huile essentielle de *S.molle*.

II.3.1.3.3. Inhibition de la motilité

L'huile essentielle de *S. molle* a révélé un pouvoir inhibiteur dose-dépendant sur la mobilité de *S. aureus* (Fig 32 et Fig 33). Aux concentrations les plus faibles 12,5 et 25 mg/mL), la diminution du diamètre de la mobilité restait modérée. En revanche, pour les concentrations comprises entre 100 et 200 mg/mL, l'inhibition devenait très significative pour l'ensemble des souches testées. Les souches S01 et S03 se sont révélé les plus sensibles, présentant un diamètre de motilité minimale de (1,00 ± 0,00 mm) à la concentration de 200 mg/mL.

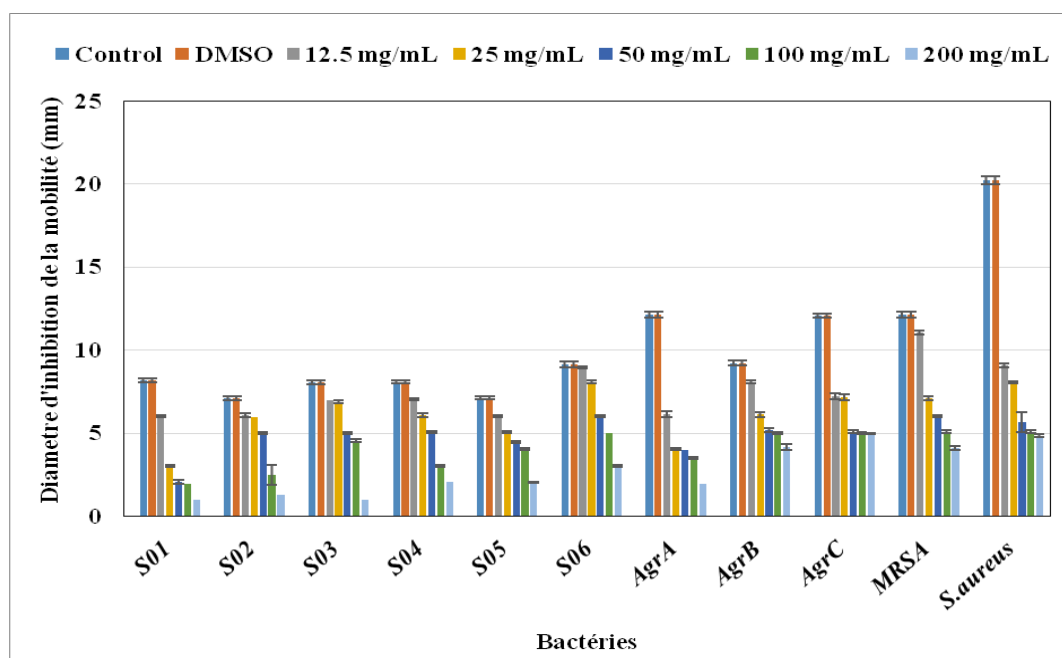


Figure 32 : L'effet de l'huile essentielle de *S. molle* sur la mobilité des souches de *S. aureus*.

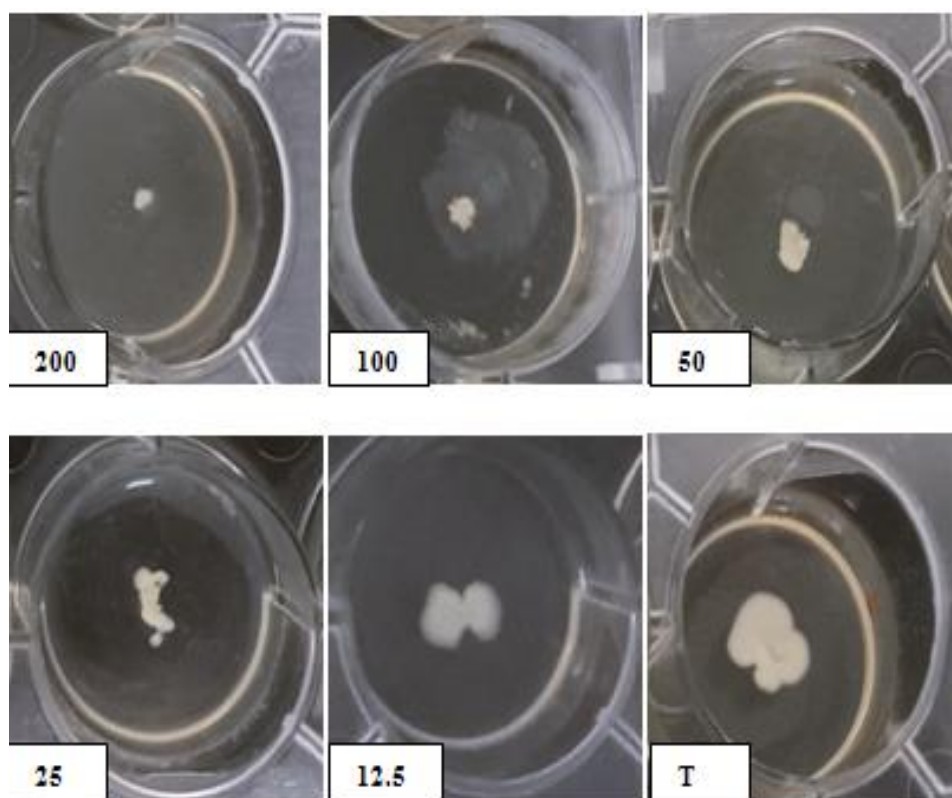


Figure 33 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle de *S. molle* sur la mobilité des souches de *S. aureus*

II.3.1.3.4. Inhibition des EPS par l'HE de *S. molle*

L'analyse quantitative de la production des EPS en présence de l'HE de *S. molle* à différentes concentrations a révélé une diminution substantielle de la production d'EPS dans les souches mutantes Agr, en comparaison aux souches isolées (Fig 34). Plus précisément, dans la concentration 200 g/L, l'inhibition des EPS est de $93,78 \pm 0,03\%$, par contre elle est de $92,17 \pm 0,10 \%$ pour AgrA et de $91,92 \pm 0,06 \%$ pour AgrC et AgrB.

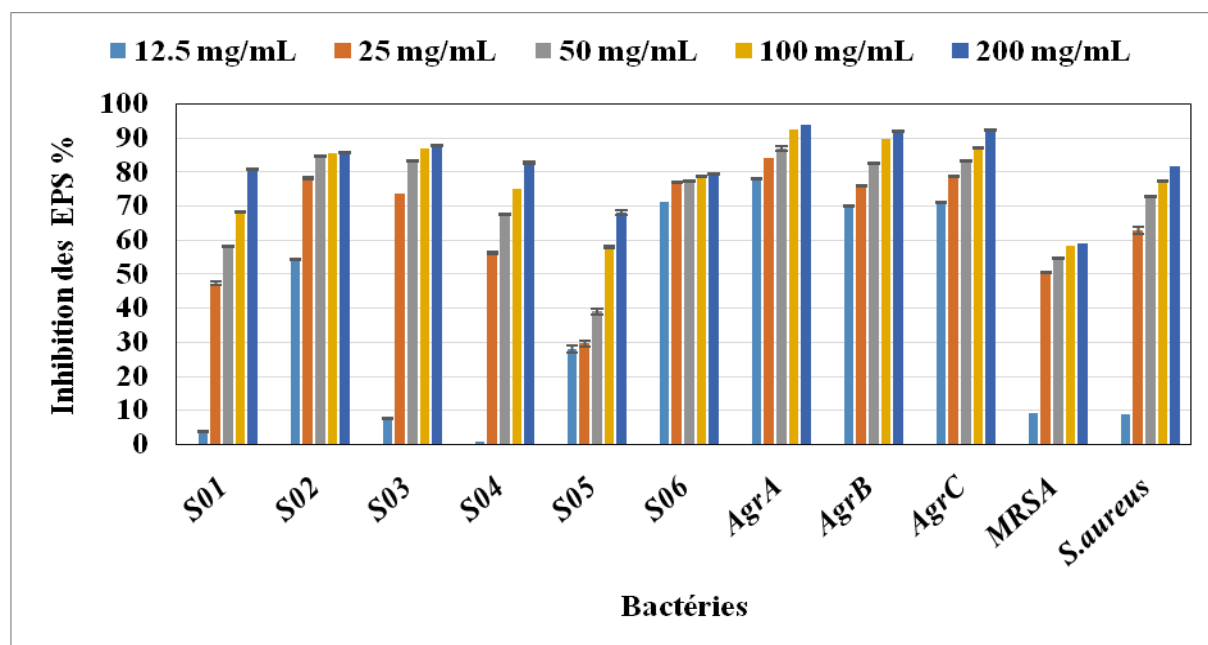


Figure34 : Effet de l'huile essentielle de *S. molle* sur la production d'EPS chez les souches de *S. aureus*

II.3.1.3.5. Inhibition du Biofilm

L'inhibition du biofilm de *S. aureus* a été évaluée par un test quantitatif au cristal violet. L'huile essentielle (HE) de *S. molle* a montré un effet inhibiteur significatif sur la production de biofilm, selon une relation dose-dépendante pour des concentrations comprises entre 100 et 200 mg/mL (Fig 35).

Les souches S03 et S06 ont présenté une sensibilité particulière, contrairement à la souche S04 qui n'a révélé qu'une faible inhibition à 12,5 mg/mL. Les mutants du système Agr ont montré des profils variables ; le mutant AgrA s'est distinguée par une sensibilité élevée, tandis qu'AgrB et AgrC n'ont exprimé aucune inhibition aux faibles doses. Par ailleurs, la souche résistante à la méthicilline (SARM), s'est révélée globalement moins sensible. Dans l'ensemble, les résultats ont montré une inhibition significative du développement du biofilm,

avec un niveau maximal d'inhibition de 92,87 % ($P < 0,01$) à 200 mg/mL. Ces résultats ont validé l'interférence de l'HE de *S. molle* sur la formation du biofilm. Des résultats similaires ont été reportés par Cutro et *al.*, (2023) en utilisant l'HE de *S. airera*.

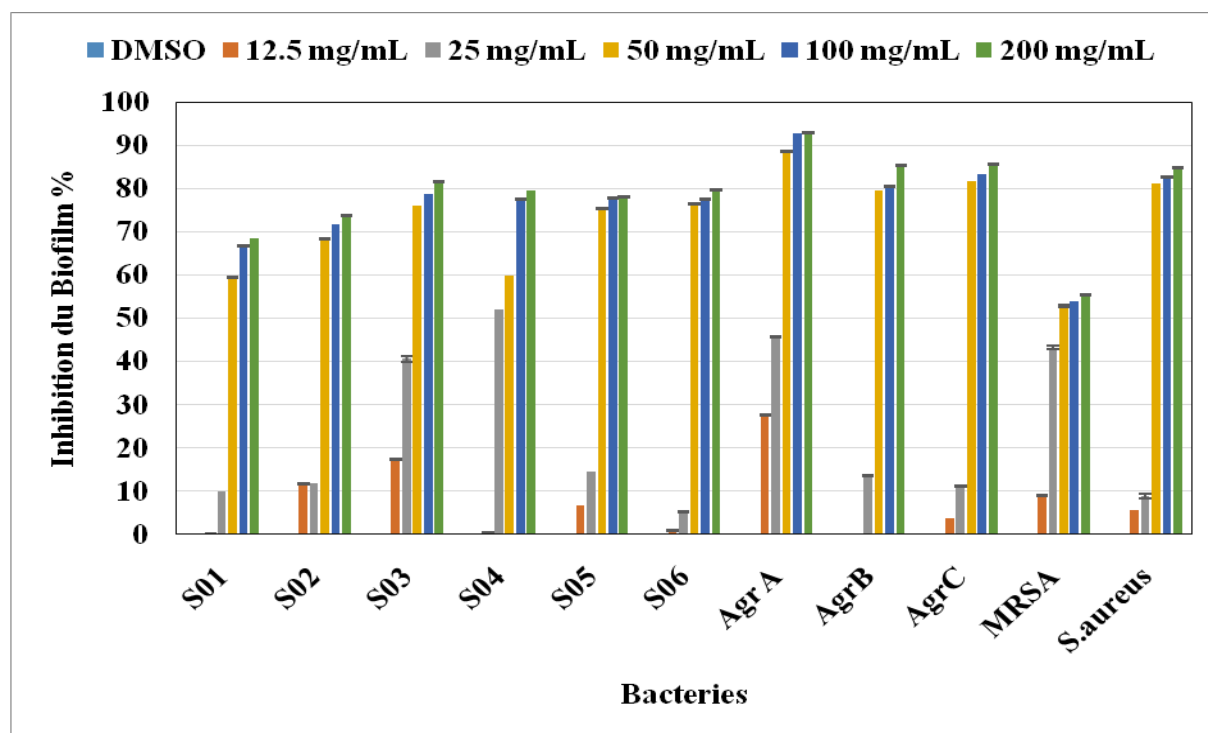


Figure 35 : Effet de l'huile essentielle de *S. molle* sur la production du Biofilm chez les souches de *S. aureus*

II.3.2. Étude de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Eucalyptus globulus*

Les résultats de l'inhibition de la croissance microbienne par l'HE d'*E. globulus* révèlent une activités antibactériennes notables contre les souches isolées et mutantes de *S. aureus*, en fonction des différentes concentrations (Fig36).

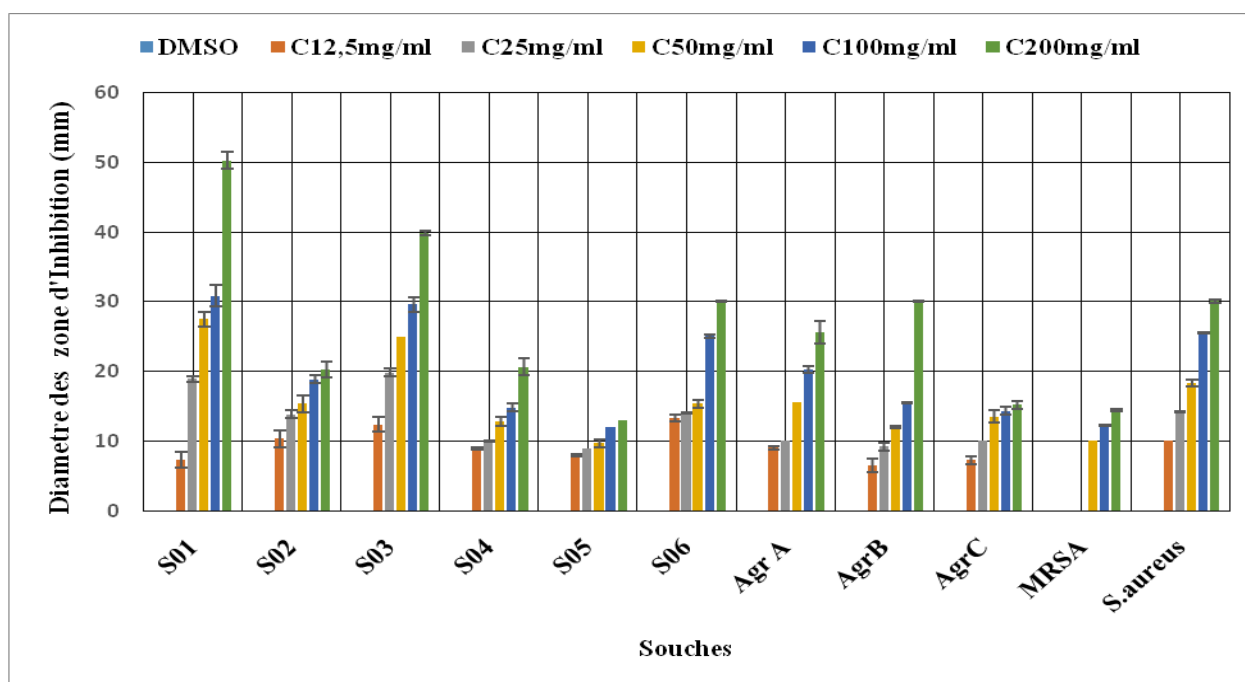


Figure 36: Activité antibactérienne de l’huile essentielle d’*E. globulus* contre les souches de *S. aureus*.

Les zones d’inhibition mesurées variaient entre $7,00 \pm 0,50$ mm et $50,33 \pm 0,57$ mm. La concentration de 200 mg/mL a engendré l’effet le plus prononcé, notamment pour la souche S01, et a entraîné une inhibition élevée pour l’ensemble des souches testées. En revanche, la concentration de 12,5 mg/mL n’a induit que de faibles diamètres d’inhibition, illustrant une réponse nettement dose-dépendante. Parmi les mutants testés, AgrB a présenté la sensibilité la plus importante, avec un diamètre d’inhibition de $30,03 \pm 0,05$ mm, contre $25,63 \pm 0,77$ mm pour AgrA et $15,16 \pm 0,28$ mm pour AgrC.

Ces résultats s’accordent largement avec ceux rapportés par Bouras et al. (2016), Iseppi et al. (2021), Farsi et al. (2022) El Guerrouj et al. (2023) et Shah et al. (2023). Ces auteurs ont observé que l’HE d’*E. globulus* induit des diamètres de zones d’inhibition compris entre 8 à 14, 10,83, 11,3311 et 20 mm contre *S. aureus*, respectivement. Ces observations indiquent une sensibilité considérable des souches de SARM testées à l’HE d’*E. globulus* (Raho et Benali, 2012). Salem et al. (2018) ont démontré que l’activité antibactérienne de l’HE varie en fonction du stade de développement de la plante. Les zones d’inhibition maximales ont atteint 38 mm au stade végétatif, tandis qu’elles n’étaient que de 24 mm pendant les phases de floraison et la fructification.

Les variations de l’activité antibactérienne exercées par l’HE d’*E. globulus* pourraient être attribuées à sa composition chimique. En effet, Merghni et al. (2018) ont comparé les

zones d'inhibition de l'HE d'eucalyptus et de son constituant majeur, le 1,8-cinéole, et ils ont rapporté que l'huile présentait une activité plus faible que ce dernier. Le diamètre des zones d'inhibition obtenues avec l'huile d'eucalyptus variaient entre 10,7 mm et 26,3 mm, tandis que ceux obtenus avec le 1,8-cinéole atteignait ≥ 29 mm.

Le 1,8-cinéole, également connu sous les appellations cinéole ou eucalyptol, est le constituant majeur de l'huile essentielle (HE) d'eucalyptus, selon l'analyse obtenue par GCMS. Ce composé est largement présent dans de nombreuses plantes aromatiques et médicinales (Miranda et al., 2016). Outre son rôle déterminant dans l'activité antimicrobienne de l'huile, l'eucalyptol a fait l'objet de plusieurs études mettant en évidence ses effets antioxydants, anti-inflammatoires, antinociceptifs et antifongiques potentiels (Dhakad et al., 2018).

Parallèlement, Guerra et al. (2012) et Roso et al. (2020) ont révélé que la variabilité de l'activité antibactérienne de l'HE d'eucalyptus résulte principalement des effets synergiques entre ses constituants majeurs et secondaires, plutôt que de l'action isolée d'un seul composé. Souto et al. (2022) et Nunes et al. (2022) ont rapporté que les composants tels que le 1,8-cinéole, le citronellol, l' α -pinène, le β -pinène et le limonène présentent une activité toxique contre une large gamme de micro-organismes, incluant des bactéries, des virus et des champignons.

L'activité antimicrobienne de l'HE d'eucalyptus s'explique par plusieurs mécanismes complémentaires, notamment la dénaturation des protéines bactériennes, l'inactivation des enzymes clés, la modification de la perméabilité membranaire chez les bactéries à Gram négatif ainsi que sur la chélation des ions cationiques intracellulaires, perturbant ainsi l'équilibre métabolique des cellules microbiennes (Noronha et al., 2014).

Afin d'évaluer l'effet anti virulent et anti-biofilm de l'HE d'*E. globulus*. La concertation minimale inhibitrice (CMI) et la (sous-CMI) ont été déterminés. La CMI a été fixée à 100 mg/ml pour toutes les souches de *S. aureus* étudiés. À titre de comparaison, El Guerrouj (2023) a rapporté que les huiles essentielles présentaient des CMI comprises entre (8mg/ml et 16mg/ml) vis-à-vis *S. aureus*.

II.3.2.2. Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing de l'HE de l'*E. globulus*

Les résultats relatifs à l'inhibition de la violacéine montrent que l'HE exerce un effet anti-QS aux concentrations de 25 et 50 mg/mL, avec des diamètres d'inhibition respectifs de $14,1 \pm 0,17$ mm et $18,46 \pm 0,05$ mm (Fig 37). Ces observations sont en accord avec celles de Luís et al. (2015), qui ont rapporté un effet anti-QS de l'HE d'*E. globulus* contre *C. violaceum* I2472 avec un diamètre de 10 mm.

De manière similaire, Merghni *et al.* (2018) et Sagar *et al.* (2022) ont montré que l'HE d'*E. globulus* présentait une activité anti-QS plus significative que celle de son constituant principal, le 1,8-cinéole, avec un diamètre d'inhibition de la violacéine près de trois fois supérieur.

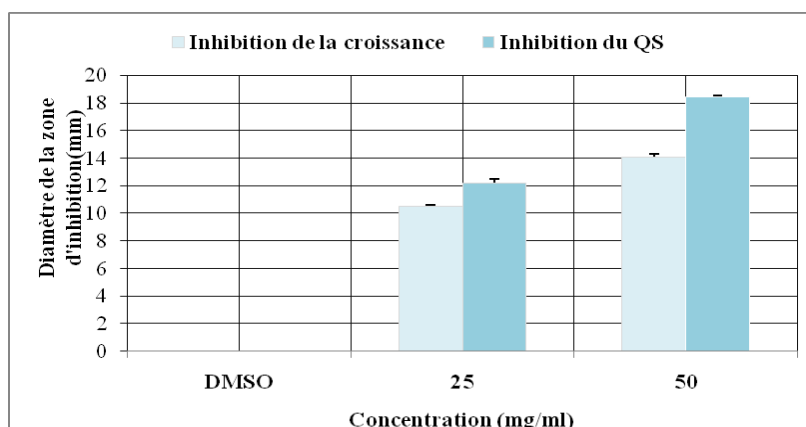


Figure 37: L'effet anti quorum sensing de l'huile essentielle d'*E. globulus* contre *C. violaceum*

494

II.3.2.2.2. Quantification de la violacéine

L'effet d'*E. globulus* sur la synthèse de violacéine a été évalué par une quantification spectrométrique en présence et en absence d'HE. Les résultats ont démontré que l'huile inhibe de manière significative la production de violacéine respectivement à 25 et 50 mg/mL, de (56,09±0,10%) et de (83,11± 0,70%) ($P < 0,01$) chez *C. violaceum* 494 (Fig 38). Ces résultats sont cohérents avec les études de Luís *et al.* (2015) et Ceballos *et al.* (2015) qui ont montré la capacité de l'HE d'*E. globulus* à inhiber la production de violacéine de *C. violaceum*.

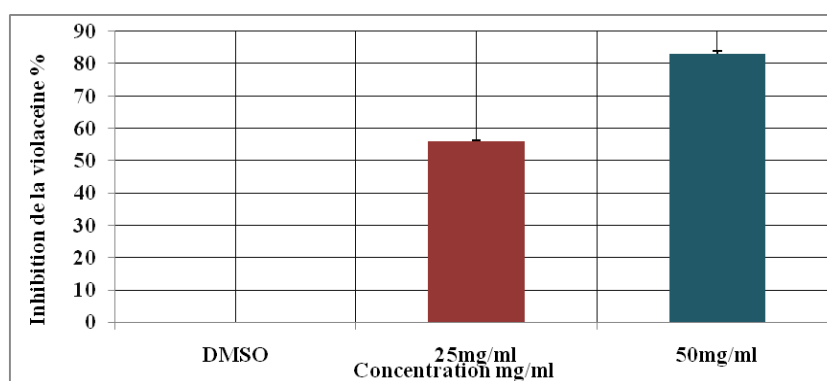


Figure 38: Effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur la production de violacéine chez *C. violaceum* 494

II.3.2.3. Effet de l'HE d'*E. globulus* sur les facteurs de virulence

II.3.2.3.1. L'inhibition de Staphyloxanthin

L'huile essentielle d'*E. globulus* a montré un effet inhibiteur significatif sur la production de la staphyloxanthine dans la plupart des souches testées de *S. aureus* (Fig 39). Les souches mutantes AgrA et AgrB ont présenté les niveaux d'inhibition les plus élevés atteignant environ 98 – 99 %, ce qui reflète leurs fortes sensibilités vis-à-vis l'HE d'*E. globulus*. Par ailleurs, les souches S01 et S04 présentent une inhibition supérieure à 90 %, confirmant l'efficacité notable de l'huile. En revanche, la souche MRSA s'est révélée la moins sensible comparativement aux autres souches.

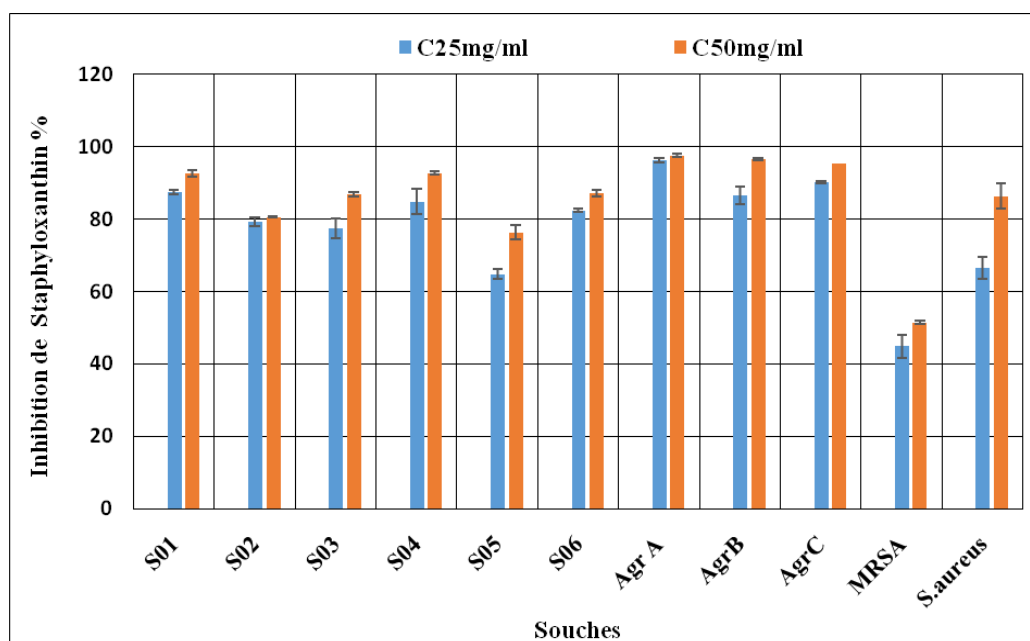


Figure 39: Effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur la production de la staphyloxanthine chez les souches cliniques et mutantes de *S. aureus*

II.3.2.3.2. L'inhibition de la motilité

Les résultats de l'effet inhibiteur de l'HE d'*E. globulus* sur la voie de motilité par glissement de *S. aureus* révèle une inhibition significative de la motilité de l'ensemble des souches étudiées de *S. aureus*. Les diamètres de la motilité diminuent en fonction de la concentration de l'huile (Fig 40).

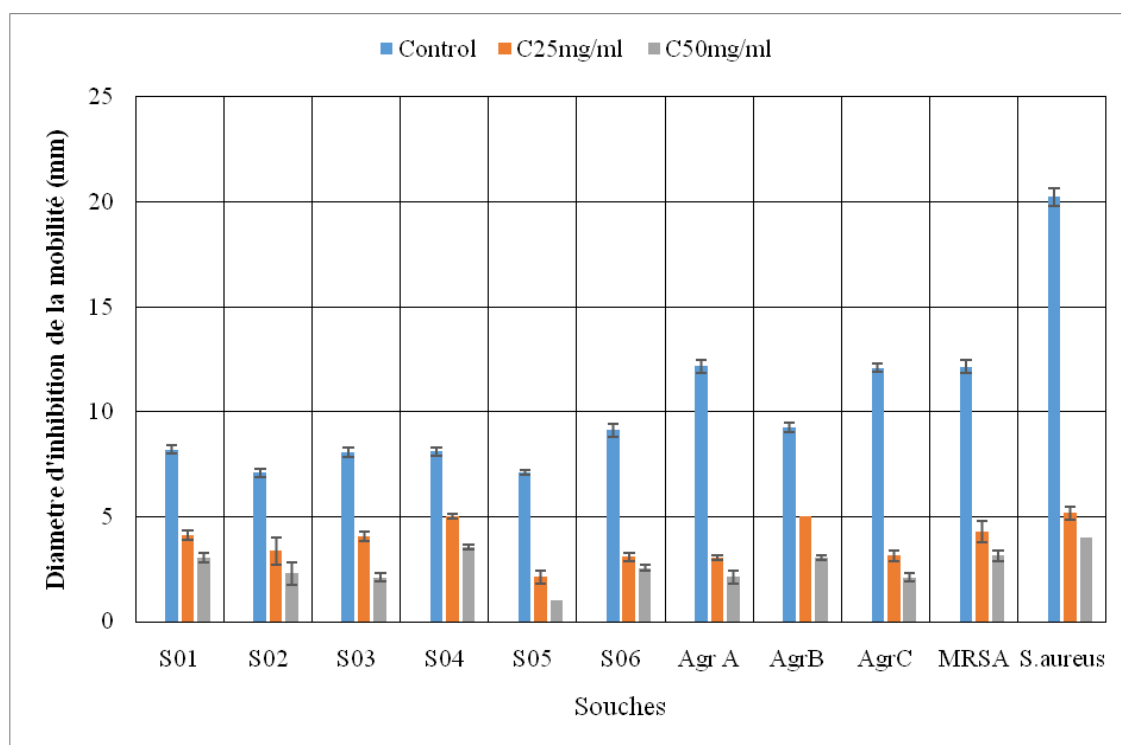


Figure 40: Effet de l'huile d'*E. globulus* sur la mobilité d souches cliniques et mutantes de *S. aureus*

II.3.2.3.3. L'inhibition de slime

L'huile essentielle (HE) d'*E. globulus* a une capacité de réduire la production de Slime dans toutes les souches étudiées (Tab 19), ce qui a été détecté par un changement de couleur du noir au rouge bordeaux (Fig 41).

Tableau 19: Effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur la production de slime

Conc. (mg/mL)	S01	S02	S03	S04	S05	S06	AgrA	AgrB	AgrC	MRSA	<i>S.aureus</i>
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) Absence de la coloration noire autour des colonies ce qui signifie inhibition de la production de slime par l'HE d'*E.globulus*.

(+) Présence de la coloration noire autour des colonies ce qui signifie la non inhibition de la production de slime par l'huile essentielle d'*E.globulus*.

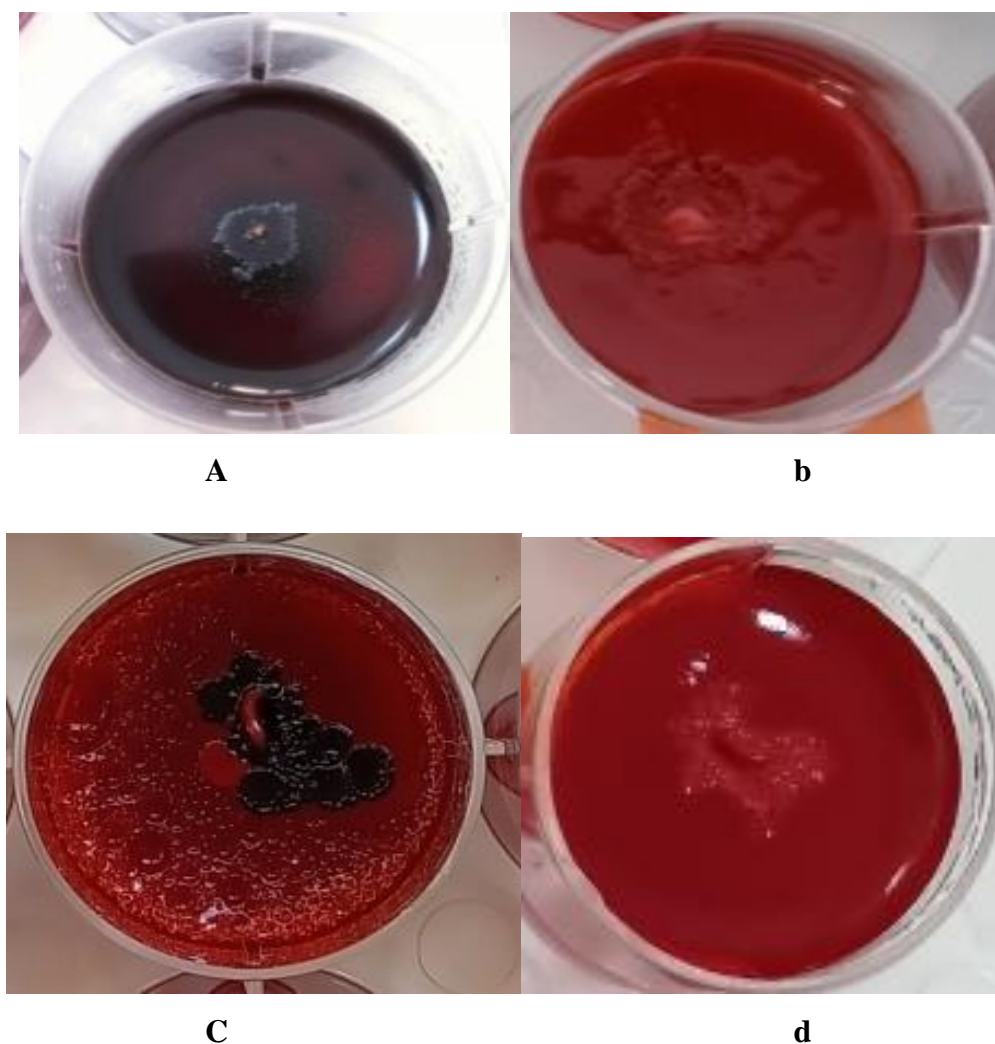


Figure 41 : Effet de l'huile d'*E. globulus* sur la production de slime sur gélose rouge Congo.

(a,c): producteur de slime positif (apparition de couleur noire autour des colonies), (b, d): producteur de slime négatif (absence de couleur noire).

II.3.2.3.4.L'inhibition des EPS

L'évaluation de la capacité de l'HE à réduire la matrice exopolymérique des souches de *S. aureus*, réalisée par quantification de l'EPS, a révélé une inhibition significative de la production d'EPS chez l'ensemble des bactéries testées (Fig 42). L'inhibition la plus marquée a été observée chez les souches mutées par rapport aux souches sauvages.

Ces résultats mettent en évidence l'impact significatif de l'HE d'*E. globulus* sur la production d'EPS. Une inhibition remarquable a été observée chez les souches mutantes AgrA,

AgrC à la concentration de 200 mg/mL, atteignant respectivement $95,4 \pm 0,14$ % et $95,06 \pm 0,15$ %, par contre AgrB a présenté une inhibition de $93,87 \pm 0,08$ %. Ces observations suggèrent que les altérations génétiques liées au système Agr accentuent la sensibilité des souches sous l'effet des huiles essentielles.

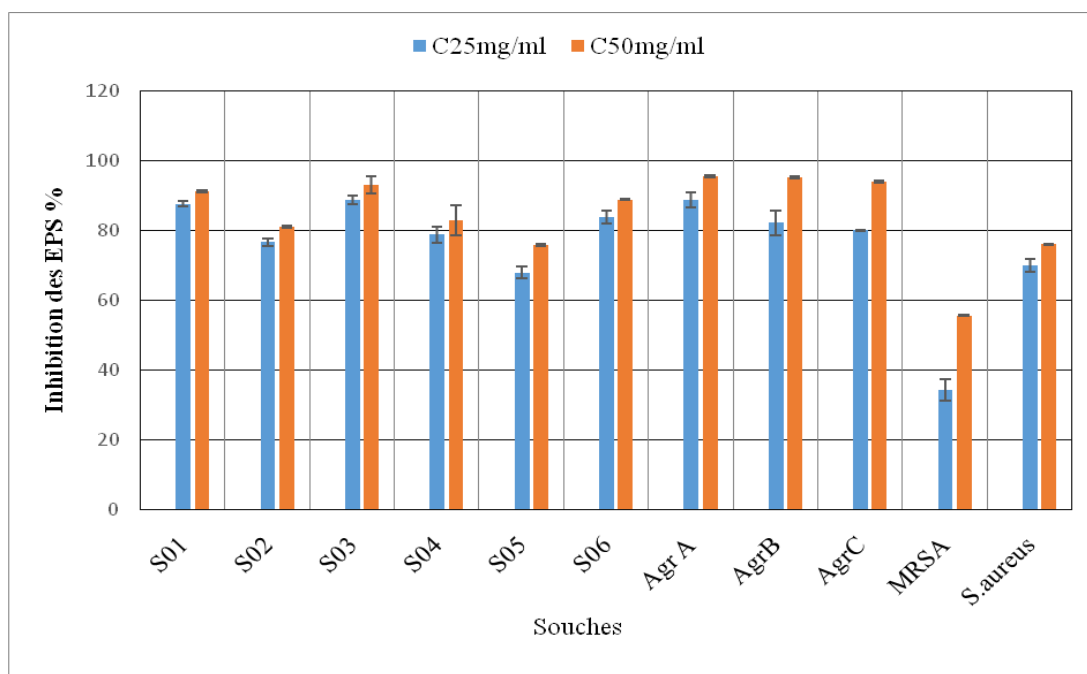


Figure 42 : Effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur la production des EPS chez les souches de *S. aureus*.

II.3.2.3.5. Inhibition de la formation de biofilm

Les résultats montrent que l'HE d'*E. globulus* a inhibé la formation de biofilm chez toutes les souches de *S. aureus*, spécialement avec la dose 50mg/mL (Fig 43), particulièrement, chez la souche MRSA (Fig 43) (Punitha et al., 2014; Vieira et al., 2017) .

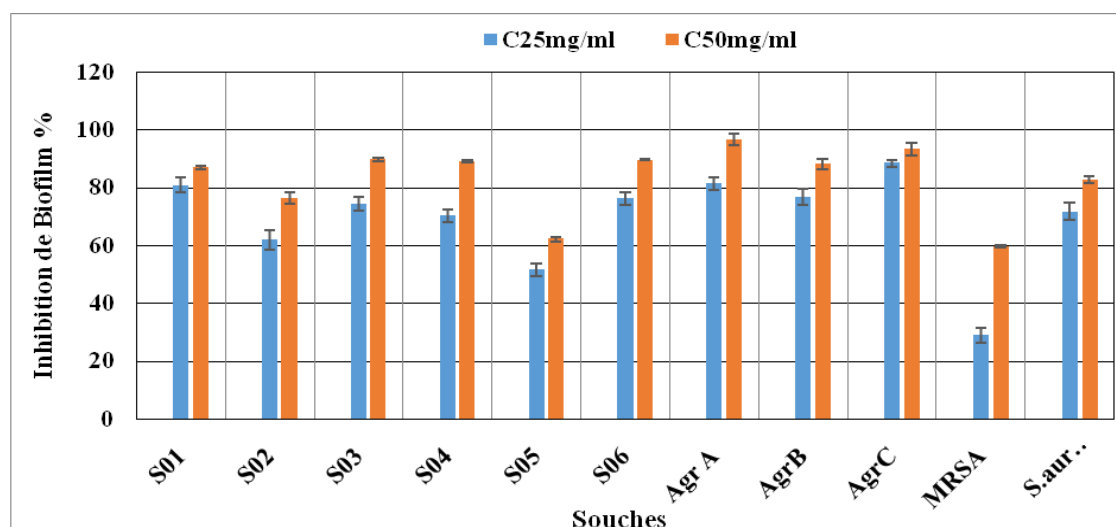


Figure43 : Effet de l’huile essentielle d’*E. globulus* sur la production du Biofilm chez les souches de *S. aureus*.

Ces résultats sont cohérents avec l’étude menée par Merghni *et al.* (2018), qui ont montré que l’HE d’*E. globulus* et son composé majoritaire, le biocalyptol, inhibaient la formation de biofilm, avec des valeurs de réduction comprises entre ($74,74 \pm 2,05$ % et $90,81 \pm 4,05$ %). De plus, Hendry *et al.* (2012) ont démontré que l’huile d’*E. globulus* exerçait un effet positif à la fois contre la formation de biofilm et les modes de croissance planctoniques.

II.3.2.3.6. Observation microscopique optique

L’effet de l’huile d’*E. globulus* (25 et 50 mg/mL) sur l’adhérence de surface a été observé par le microscope optique (Fig 44). La présence de l’huile a réduit la formation de biofilm sur les lames en verre traitées pour toutes les souches. Une forte formation de biofilm a été observée chez le témoin.

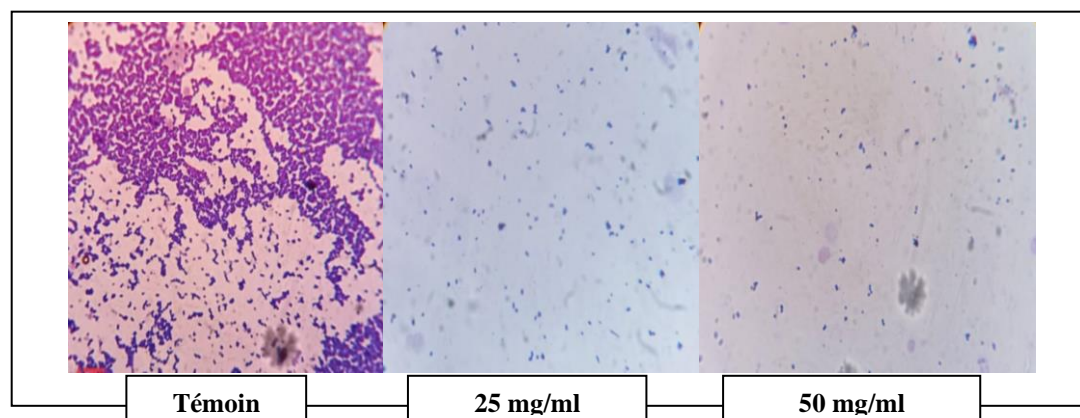


Figure 44 : Observation de l’inhibition de la formation de biofilm chez *S. aureus* traité par l’huile d’*E. globulus* au microscope optique (1000x).

II.4. Etude *in silico* de l'effet des huiles essentielles (HEs):

II.4.2. Interactions des composants des huiles essentielles avec les protéines de *S. aureus* (STRING /STITCH)

L'analyse *in silico* réalisée à l'aide de logiciels STRING et STITCH a permis de générer un réseau d'interactions illustrant les relations potentielles entre les composants des huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* et les protéines de *S. aureus* (Fig 45, Fig 46 a et Fig 46 b).

L'étude STRING nous a permis de repérer les protéines les plus centrales avec leurs interactions solides (score $\geq 0,7$) et de visualiser clairement les protéines (hubs) du réseau et les clusters fonctionnels majeurs. Le regroupement staphyloxanthine (crtM, crtN, crtO, crtP et crtQ), se distingue par son degré de connexion variant entre 4 et 6 et sa forte interaction avec un score atteignant jusqu'à 0,999, ce qui signifie qu'ils ont un rôle important dans la biosynthèse de la staphyloxanthine (Tab 20). Simultanément, le cluster biofilm et adhésion (fnbA, spa, hly et hlb), montre aussi plusieurs interactions solides, traduisant que fnbA joue un rôle essentiel dans la formation du biofilm et la virulence. Enfin, le groupe (ABD29296.1, ABD29298.1 et ABD29299.1) regroupe des protéines non identifiées mais fortement reliées, ce que signifie qu'elles pourraient jouer un rôle dans la virulence bactérienne (Fig 46).

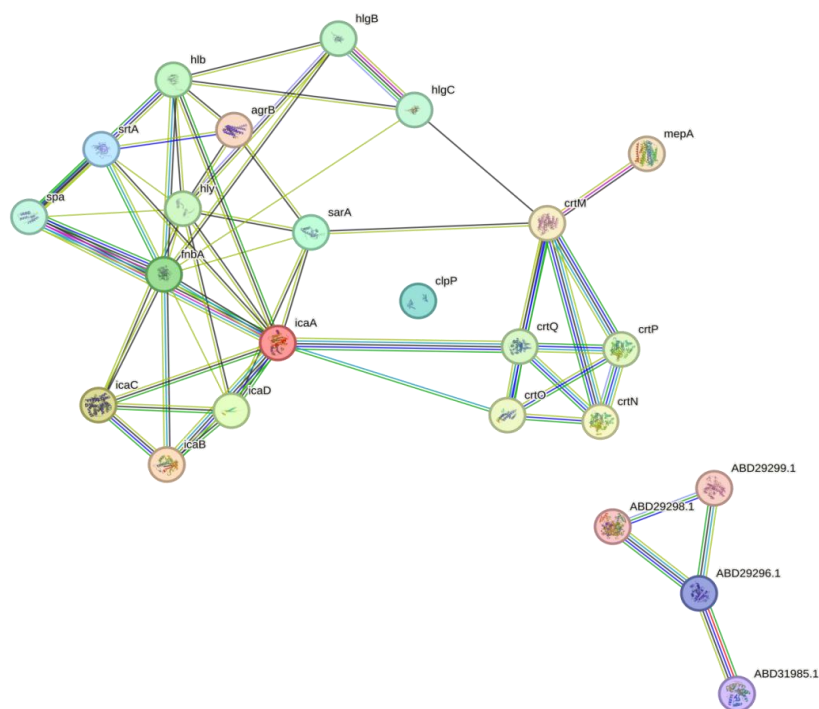


Figure 45 : Relations topologiques du réseau entre les protéines de *S. aureus*.

Tableau 20 : Les scores d'interactions entre les protéines de *S. aureus*.

Protein1	Protein2	combined_score	Protein1	Protein2	combined_score
ABD29296.1	ABD29299.1	0,839	crtN	crtO	0,951
ABD29296,1	ABD29298.1	0,864	crtN	crtQ	0,979
ABD29296.1	ABD31985.1	0,871	crtN	crtP	0,992
ABD29298.1	ABD29299.1	0,888	crtO	crtQ	0,998
crtM	mepA	0,732	crtO	crtP	0,969
crtM	hlgC	0,723	crtP	crtQ	0,998
crtM	crtN	0,999	fnbA	spa	0,967
crtM	crtO	0,944	fnbA	hly	0,749
crtM	crtQ	0,957	fnbA	hly	0,711
crtM	crtP	0,988			

crtM, crtN, crtO, crtP, crtQ : des gènes codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la staphyloxanthine chez *S. aureus*. **fnbA** : Fibronectin-binding protein A. **spa** : Staphylococcal protein A. **hly, hlb** : Codent pour des hémolysines, toxines qui lyse les globules rouges. **ABD29296.1, ABD29298.1, ABD29299.1** : identifiants d'accès (accession numbers) dans une base de données de protéines, correspondant à des séquences spécifiques. **Hubs** : gènes clés dans un réseau de régulation liés à la virulence chez *S. aureus*.

L'étude STITCH nous a permis d'observer les interactions entre les composants de l'HE de *S. molle* et d'*E. globulus* avec les protéines de *S. aureus*. Les composants de l'HE de *S. molle*, tels que l'humulene, l'elemene, le caryophyllene, l' α -pinène, le limonene et le sabinene, et ceux d'*E. globulus*, tels que, l' α -pinène, le β -pinène, Limonene, 1,8-cinéole, γ -terpinène, terpinolène et terpinen-4-ol, démontrent une interaction significative avec les protéines de *S. aureus* avec des scores élevés (Fig 46 A et Fig 46 B). Cette interaction peut influencer la synthèse de staphyloxanthine, l'activité enzymatique, la formation de biofilm et la pathogénicité bactérienne. On observe une interaction remarquable entre les composants de l'HE, ce qui signifie l'effet synergétique qui renforce l'activité biologique de ces huiles (Tab 21 et Tab 22).

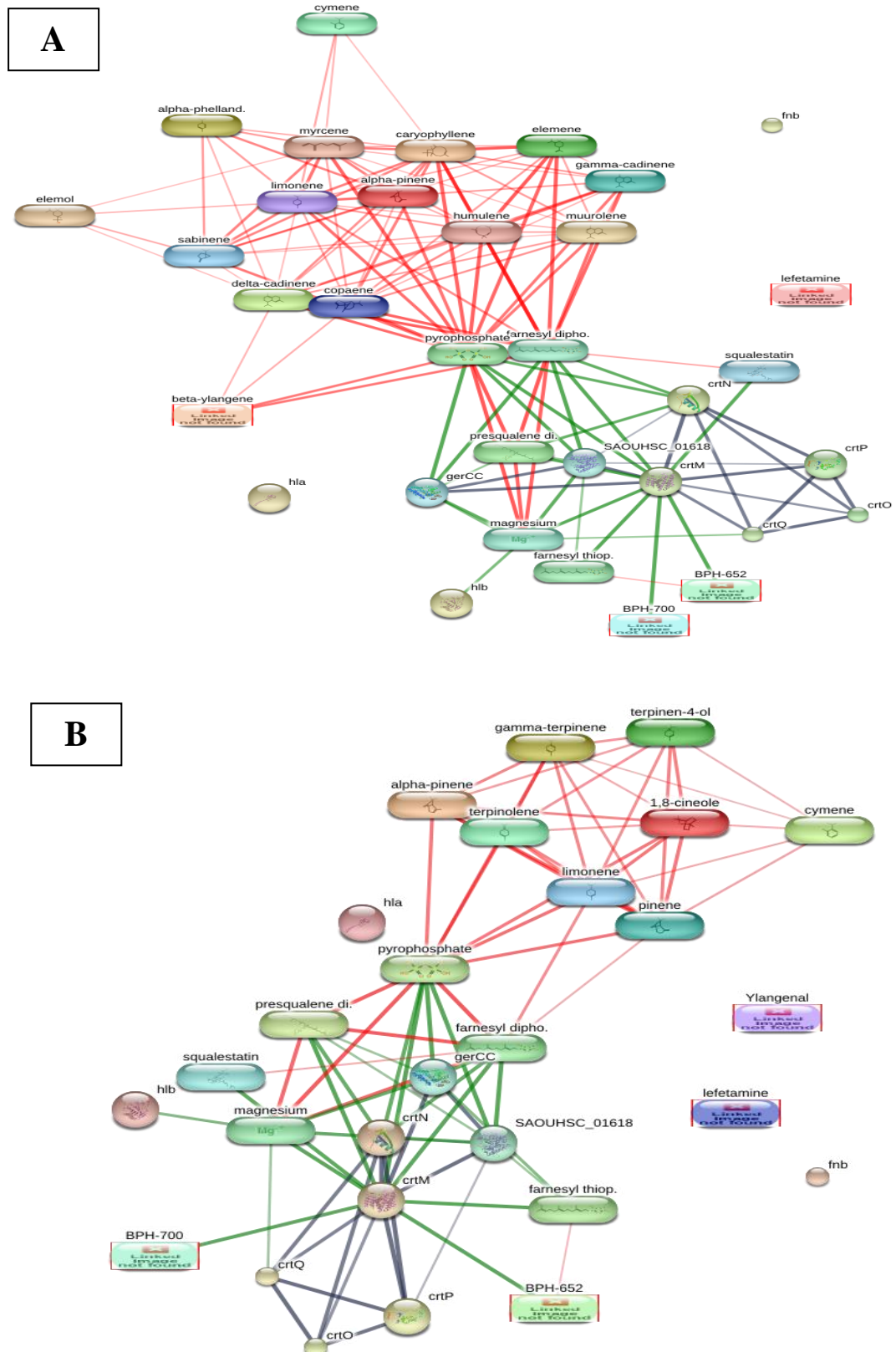


Figure 46 : Relations topologiques du réseau entre les composés des huiles essentielles et les protéines de *S. aureus*. (A: Résultats STITCH avec les composants de *S. molle*, B: Résultats STITCH avec les composants d'*E. globulus*).

Tableau21 : les scores et les interactions entre les composants de l'huile essentielle de *S. molle* et les protéines de *S. aureus*.

Élément 1	Élément 2	Score	Type d'interaction	Élément 1	Élément 2	Score	Type d'interaction
crtM	humulene	0,974	protéine-composé	crtO	caryophyllene	0,762	protéine-composé
crtM	elemene	0,964	protéine-composé	crtP	copaene	0,749	protéine-composé
crtM	caryophyllene	0,943	protéine-composé	crtQ	alpha-phellandrene	0,732	protéine-composé
crtM	delta-cadinene	0,937	protéine-composé	alpha-pinene	limonene	0,843	composé-composé
crtM	gamma-cadinene	0,890	protéine-composé	caryophyllene	elemene	0,973	composé-composé
crtQ	limonene	0,853	protéine-composé	elemene	humulene	0,964	composé-composé
crtQ	alpha-pinene	0,843	protéine-composé	delta-cadinene	gamma-cadinene	0,749	composé-composé
crtO	humulene	0,835	protéine-composé	sabinene	limonene	0,762	composé-composé
crtN	humulene	0,821	protéine-composé	caryophyllene	limonene	0,762	composé-composé
crtN	myrcene	0,820	protéine-composé	sabinene	myrcene	0,748	composé-composé
crtP	alpha-pinene	0,816	protéine-composé	alpha-pinene	myrcene	0,746	composé-composé
Hlb	beta-ylangene	0,814	protéine-composé	caryophyllene	copaene	0,745	composé-composé
fnbA	sabinene	0,800	protéine-composé	alpha-pinene	caryophyllene	0,740	composé-composé
Spa	limonene	0,800	protéine-composé	alpha-pinene	sabinene	0,739	composé-composé
fnbA	myrcene	0,800	protéine-composé	alpha-pinene	alpha-phellandrene	0,732	composé-composé
crtM	myrcene	0,764	protéine-composé	caryophyllene	sabinene	0,729	composé-composé

crtM : Des gènes codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la staphyloxanthine chez *S. aureus* Première enzyme clé dans la biosynthèse du staphyloxanthine (pigment doré). Transforme le précurseur farnésyl-diphosphate en pré-squalène. **crtN** : Transforme le pré-squalène en dihydroxy-squalène (étape suivante dans la voie). **crtO, crtP, crtQ** Étapes suivantes de modification du précurseur vers le pigment final. **crtP** : Modification oxydative intermédiaire. **crtO** : Oxydation d'un intermédiaire spécifique. **fnbA** : protéine qui permet à la bactérie de se fixer aux cellules hôtes. **spa** : protéine A, se lie aux anticorps et aide la bactérie à échapper au système immunitaire. **hlb** : hémolysine bêta, toxine qui détruit les globules rouges.

Tableau22 : les scores et les interactions entre les composants de l'huile essentielle d'*E.globulus* et les protéines de *S. aureus*.

Élément 1	Élément 2	Score	Type d'interaction	Élément 1	Élément 2	Score	Type d'interaction
crtM	crtN	0,999	Protéine–Protéine	farnesyl diphospho,	magnesium	0,910	Composé–Composé
crtP	crtQ	0,996	Protéine–Protéine	crtN	presqualene di,	0,910	Protéine–Composé
crtO	crtQ	0,994	Protéine–Protéine	presqualene di,	magnesium	0,900	Composé–Composé
crtM	presqualene di,	0,993	Protéine–Composé	crtO	crtN	0,895	Protéine–Protéine
crtM	pyrophosphate	0,992	Protéine–Composé	crtQ	crtN	0,886	Protéine–Protéine
gerCC	pyrophosphate	0,991	Protéine–Composé	alpha-pinene	pinene	0,886	Composé–Composé
SAOUHS C_01618	pyrophosphate	0,991	Protéine–Composé	pyrophosphate	limonene	0,853	Composé–Composé
SAOUHS C_01618	farnesyl diphospho,	0,990	Protéine–Composé	pyrophosphate	pinene	0,852	Composé–Composé
farnesyl diphospho,	pyrophosphate	0,989	Composé–Composé	crtQ	crtM	0,851	Protéine–Protéine
gerCC	farnesyl diphospho,	0,987	Protéine–Composé	Pinene	limonene	0,847	Composé–Composé
crtM	BPH-652	0,986	Protéine–Composé	alpha-pinene	limonene	0,843	Composé–Composé
crtM	farnesyl thiop.	0,986	Protéine–Composé	1,8-cineole	limonene	0,821	Composé–Composé
crtM	magnesium	0,985	Protéine–Composé	1,8-cineole	pinene	0,820	Composé–Composé
crtM	farnesyl diphospho.	0,985	Protéine–Composé	pyrophosphate	alpha-pinene	0,816	Composé–Composé
crtP	crtM	0,985	Protéine–Protéine	pyrophosphate	1,8-cineole	0,815	Composé–Composé

Résultats et discussion

crtP	crtN	0,981	Protéine– Protéine	pyrophosp hate	gamma- terpinene	0,800	Composé–Composé
crtM	SAOUHS C_01618	0,978	Protéine– Protéine	pyrophosp hate	terpinolene	0,800	Composé–Composé
presqualen e di.	farnesyl dipho.	0,974	Composé– Composé	Hlb	magnesium	0,773	Protéine–Composé
magnesi um	pyrophos phate	0,973	Composé– Composé	1,8-cineole	terpinen-4-ol	0,764	Composé–Composé
crtM	BPH-700	0,971	Protéine– Composé	terpinen-4- ol	pinene	0,745	Composé–Composé
presqualen e di,	pyrophos phate	0,970	Composé– Composé	1,8-cineole	alpha-pinene	0,741	Composé–Composé
crtM	gerCC	0,969	Protéine– Protéine	terpinolene	pinene	0,739	Composé–Composé
crtM	squalestat in	0,964	Protéine– Composé	gerCC	farnesyl thiop,	0,739	Protéine–Composé
crtO	crtP	0,953	Protéine– Protéine	alpha- pinene	gamma- terpinene	0,739	Composé–Composé
SAOUHS C_01618	magnesi um	0,933	Protéine– Composé	terpinolene	limonene	0,739	Composé–Composé
gerCC	magnesi um	0,923	Protéine– Composé	crtO	crtM	0,738	Protéine–Protéine
crtN	farnesyl dipho.	0,923	Protéine– Composé	gamma- terpinene	limonene	0,730	Composé–Composé
SAOUHS C_01618	gerCC	0,921	Protéine– Protéine	gamma- terpinene	terpinolene	0,725	Composé–Composé
crtN	pyrophos phate	0,912	Protéine– Composé				

crtM : Des gènes codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la staphyloxanthine chez *S. aureus* Première enzyme clé dans la biosynthèse du staphyloxanthine (pigment doré). Transforme le précurseur farnésyl-diphosphate en pré-squalène. **crtN** : Transforme le pré-squalène en dihydroxy-squalène (étape suivante dans la voie). **crtO**, **crtP**, **crtQ** Étapes suivantes de modification du précurseur vers le pigment final. **crtP** : Modification oxydative intermédiaire. **crtO** : Oxydation d'un intermédiaire spécifique. **fnbA** : protéine qui permet à la bactérie de se fixer aux cellules hôtes. **spa** : protéine A, se lie aux anticorps et aide la bactérie à échapper au système immunitaire. **hlb** : hémolysine bêta, toxine qui détruit les globules rouges. **gerCC** : un gène régulateur dans la biosynthèse des caroténoïdes. **SAOUHSC_01618** : Identifiant d'un gène dans la base de données NCBI pour *S. aureus*. Fonction exacte à vérifier selon la base. farnesyl dipho. **arnésyl diphosphate** : précurseur chimique pour la biosynthèse du staphyloxanthine. **presqualene di** : Pré-squalène diphosphate : intermédiaire formé à partir du farnésyl diphosphate, transformé ensuite par crtM. **Magnesium** : cofacteur nécessaire pour l'activité enzymatique.

II.5. Docking moléculaire de l'interaction des composants des HEs avec AgrA de *S. aureus*

II.5.1. Docking moléculaire de l'interaction des composants de l'HE de *S. molle* avec AgrA de *S. aureus*

Les études de docking moléculaire ont permis d'évaluer les affinités de liaison de 20 composés issus de l'HE de *S. molle* avec la protéine cible ArgA (code PDB: 4G4K). Le logiciel utilisé génère jusqu'à huit conformes par composé. La conformation correspond à l'énergie la plus négative, est considérée comme la plus stable et la plus représentative pour la simulation (Tab 23). Les résultats de l'analyse de l'amarrage moléculaire ont montré que les composés de *S. molle* interagissent efficacement avec la protéine AgrA de *S. aureus*.

Tableau 23: Énergies de liaison libres avec les interactions d'acides aminés des composés bioactifs des composants de l'huile essentielle de *S. molle* dans les sites actifs d'AgrA

composés	Énergie de liaison libre	Interactions de l'hydrogène	Interactions hydrophobes
α-Pinene	-5,3	-	Phe203 - Tyr229 - Leu175
Sabinene	-5,4	-	His200
β-Myrcene	-4,7	-	Ser202 - His200 - Phe203 - Tyr229 - Asp158 - Asp176 - Leu175 - Arg178 - Asn177
α-Phellandrene	-5,6	His200	Arg178 - Asn177 - Ser231 - Arg218 -
o-Cymene	-5,5	Tyr229	Phe203 - Asp158 - Leu175
Limonene	-5,6	-	Tyr153 - Lys225
β-Elemene	5,6	-	Tyr229 - His200 - Leu175
α-Gurjunene	-7,6	-	Arg178 - Leu175 - Asp158 - Tyr229 - Glu163 - Lys167 - Phe203 - Ser202 - His200 - Asn177 - Asp176
Caryophyllene	-7,1	-	Phe203 - Leu175 - Tyr229 -

Humulene	-7,3	-	Leu175 - Tyr229 - Phe203
γ-Muurolene	-7,2	-	Tyr229 - Asp176 - Leu175 - Asn177 - His200 Ser202 - Phen203 - Glu163 - Cys228
β-Cyclogermacra ne	-7,2	-	Phe203 - Tyr229 - Leu175
α-Muurolene	-7,2	-	Phe203 - Asp176 - Arg178 - Asp158 - Leu175 - Tyr229
γ-Cadinene	-7,4	His200	Arg178
δ-Cadinene	-7,2	-	Leu175 - Val154 - Arg178 - Tyr229 - His227 - Phe203
Elemol	-6,6	-	Val154 - Arg178 - His227 - Tyr229 - Leu175
β-copaene	-7,8	-	Leu175 - Tyr229 - Arg178
α-ylangene	-7,3	-	Leu189 - Ile143 - Leu192
Guaiol acetate	-7,9	-	Tyr229 - Arg178 - Leu175 - His227 - Phe203 - His200
Tau-Cadinol acetate	-7,5	Thr166	Lys167 - His227 - Leu175 - Tyr229

Comme on peut le constater, l'acétate de guaiol, composé amarré, a montré une affinité de liaison libre maximale avec une énergie de liaison libre égale à -7,9 kcal/mol, suivi par le β -copaène (-7,8 kcal/mol), le gurjunène (-7,6 kcal/mol) et l'acétate de tau-cadinol (-7,5 kcal/mol). D'autre part, d'autres composés notables ont également montré une forte affinité de liaison, tels que le γ -cadinène (-7,4 kcal/mol), l'humulène (-7,3 kcal/mol) et l' α -

muurolène (-7,2 kcal/mol) (Fig 47). Par contre, les autres composés présentaient des énergies de liaison libre plus faibles.

Compte tenu des scores de liaison élevés détectés chez les cinq principaux composés, présentant une affinité marquée pour la protéine cible et suggérant un potentiel inhibiteur significatif, des analyses supplémentaires des interactions du mode de liaison avec le site actif ont été réalisées.

Il est bien établi que les liaisons hydrogènes jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des interactions ligand-protéine. D'après les résultats obtenus, l' α -phellandrène et le γ -cadinène ont montré une formation de liaisons hydrogènes avec His200 et des interactions faibles et non covalentes avec les résidus Arg178, Asn177, Ser231 et Arg178, respectivement.

Quant à l'acétate de tau-cadinol, il a formé des liaisons hydrogènes avec le résidu Thr166. Malgré la faible énergie de liaison de l'o-cymène (-5,5 Kcal/mol), une liaison hydrogène a été formée avec le résidu Tyr229. D'autres résidus fréquemment impliqués dans les interactions entre plusieurs composés tels que la Phen203, la Tyr229, la Leu175, la Phen203, l' His 200 et l'Arg178 ont été observé. Le ligand le plus amarré a montré de fortes interactions hydrophobes avec les résidus Tyr229, Arg178, Leu175, His227 et Phen203.

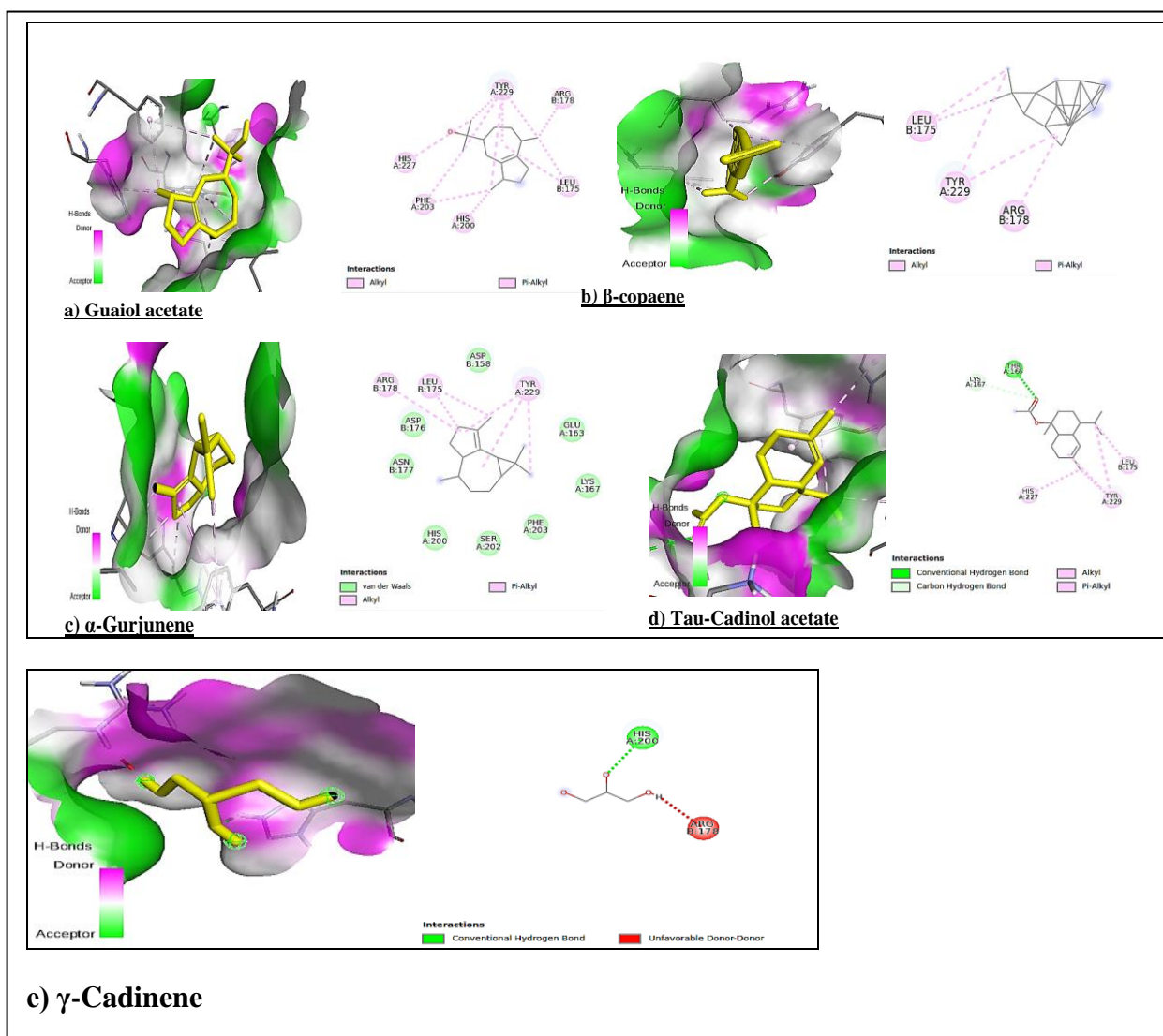


Figure 47: Modèle de site de fixation d’AgrA à l’aide du docking moléculaire: représentation 2D (à droite) et 3D (à gauche) des modes de liaison des cinq meilleurs ligands au site actif de l’opéron d’AgrA (code PDB : 4G4K). (a) Acétate de gaiöl. (b): β -copaène. (c): α -gurjunene. (d): Tau-cadinol. (e): γ -cadinene

L’opéron Agr chez *S. aureus* sert d’agent dans le mécanisme de régulation, permettant aux facteurs de transcription de moduler l’expression des gènes cibles en réponse aux signaux environnementaux (Aubourg et al., 2022).

Dans ce contexte, l’opéron AgrA a été choisi pour l’analyse *in silico* en raison de sa fonction essentielle dans la régulation du quorum sensing (S), qui contribue de manière significative à la virulence bactérienne et au développement du biofilm. Les résultats documentés dans cette recherche ont montré que tous les composés identifiés étaient capables de démontrer la capacité d’inhiber le récepteur cible (AgrA), avec des affinités de liaison prometteuses. Par exemple, l’acétate de gaiöl, le β -copaène, l’ α -gurjunène et l’acétate de tau-

cadinol sont apparus comme des composés potentiels en raison de leurs plus faibles capacités de liaison et de leur forte interférence avec le reste d'acides aminés clés dans le site actif.

Certains résidus tels que Tyr229, Leu175, Phe203 et Arg178 étaient également impliqués de manière récurrente dans les interactions ligands entre les composés à haute affinité. Ces derniers pourraient jouer un rôle essentiel dans la reconnaissance des ligands, ce qui on fait des cibles essentielles pour les stratégies de conception de médicaments. De plus, la liaison hydrogène (His200, Thr166, Tyr229) augmente la spécificité et la stabilité de la liaison. Il convient de noter que les résultats d'amarrage moléculaire sont en corrélation positive avec les résultats expérimentaux, ce qui renforce l'effet inhibiteur des composés des huiles essentielles contre l'opéron AgrA.

A la lumière des résultats obtenus pour le composé cité, il semble que l'acétate de guaïol pourrait être à l'origine du potentiel inhibiteur de l'HE de *S. molle* contre de nombreux facteurs de virulence y compris la formation de biofilm et la détection de quorum sensing. Une étude clinique menée par Khan et *al.* (2023) a mis en évidence l'activité anti-QS in vitro d'extraits de feuilles de goyave, contenant notamment du guaïol. D'autre part, des études d'amarrage in silico suggèrent que ces composés sont capables de se lier aux récepteurs de détection de quorum (QS), empêchant ainsi ces récepteurs de générer des molécules de signalisation auto-inductrices de type AHL et détruisant ainsi ces récepteurs protéiques. L'inhibition du quorum sensing QS pourrait également être résulter de plusieurs autres mécanismes complémentaires, notamment l'inhibition de la synthèse, du transport ou de la sécrétion d'auto-inducteurs, l'action antagoniste sur les récepteurs, ou encore l'inhibition des cibles en aval de la liaison du récepteur AHL (Nazzaro et *al.*, 2013; Hadjab et *al.*, 2024).

II.5.2. Moléculaire docking de l'interaction des composants de l'HE d'*E. globulus* avec AgrA de *S. aureus*

Le docking moléculaire a été réalisé sur les composés identifiés par GC-MS de l'HE d'*E. globulus* contre la protéine AgrA afin de confirmer leur activité anti-quorum sensing et de déterminer les molécules responsables de cette inhibition et à explorer le mode d'interaction de ces molécules avec la protéine étudiée.

Tableau24 : Énergies de liaison libres avec les interactions d'acides aminés des composés bioactifs des composants de l'huile essentielle d'*E. globulus* dans les sites actifs d'AgrA

Molécules	Énergie libre de liaison complexe (kcal/mol)	Molécules	Énergie libre de liaison complexe (kcal/mol)
1(10),11-Eremophiladien-9-ol	-5,630	Limonene	-3,225
Ylangenal	-5,291	Aromandendrene	-3,100
4-Terpineol	-5,080	Alloaromadendrene	-3,057
Eucalyptol	-4,520	B-cyclogermacrene	-3,186
α-Pinene	-3,899	Germacrene B	-2,852
β-Pinene	-3,360	γ -Terpinene	-2,520
o-Cymene	-3,390	Terpinolene	-2,101

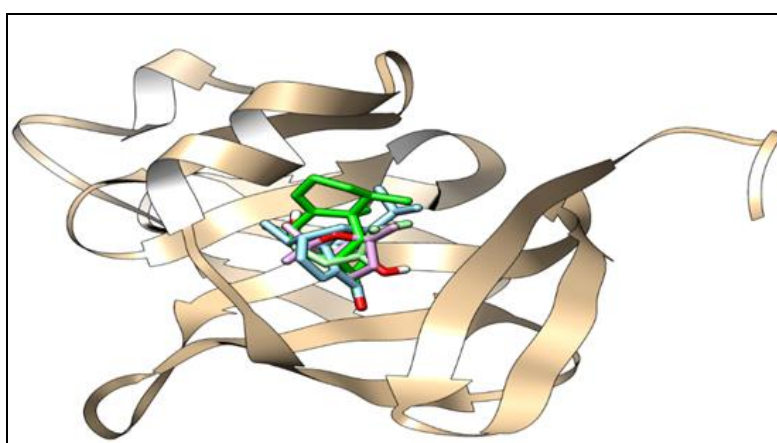


Figure 48 : Superposition du champ de liaison à l'ADN des dérivés amarrés de *S. aureus* AgrA (PDB ID: 3BS1), composé (ylangenal) (cyan), composé (4-terpinéol) (vert clair), composé (eucalyptol) (rose), composé 1(10), 11-éremophiladién-9-ol.

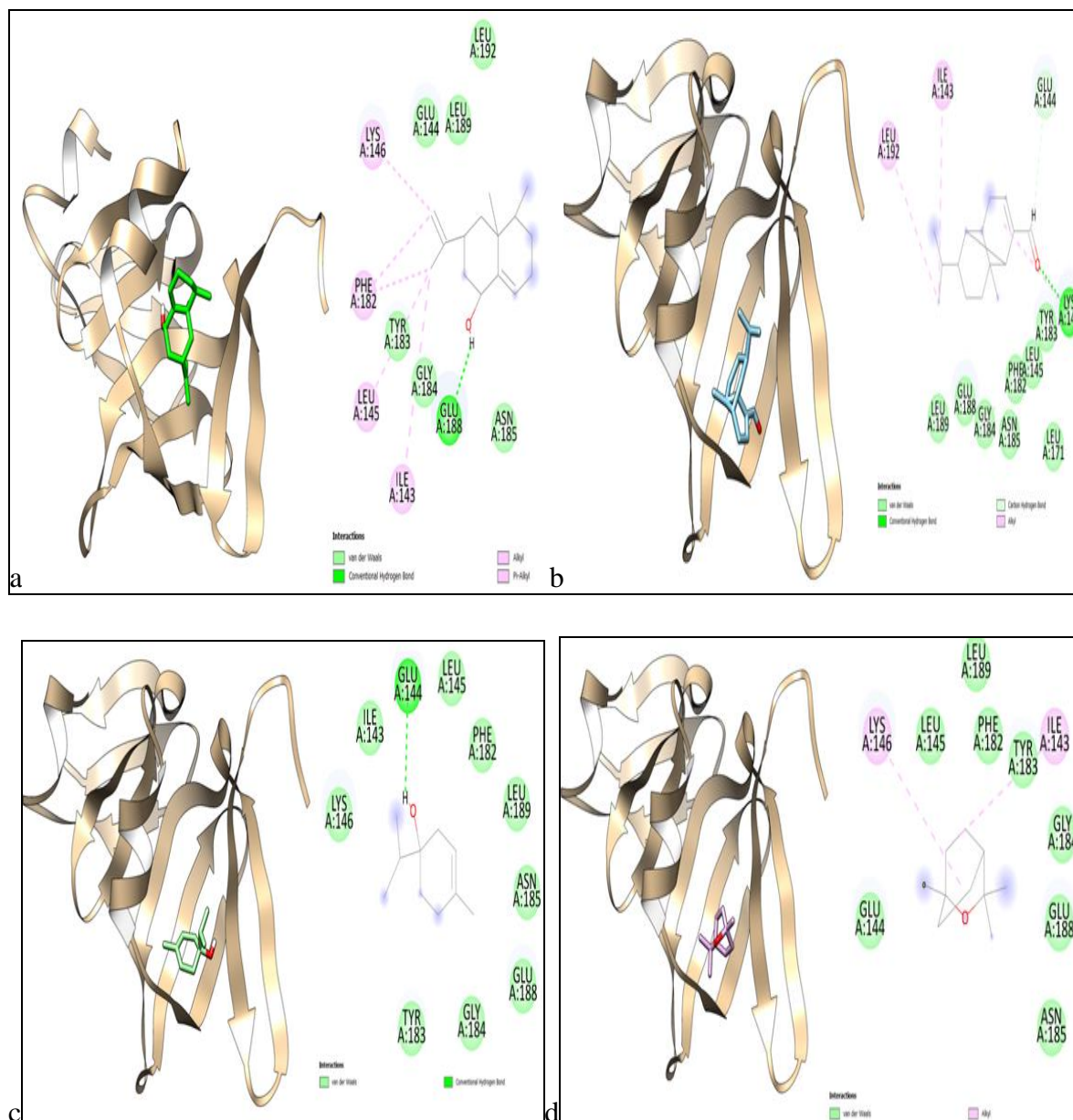


Figure 49 : Modelisation d'amarrage (a) 1(10),11-eremophiladien-9-ol; b) d'ylangenal; c) 4-terpinéol; d) eucalyptol) dans le champ de liaison de l'ADN de l'AgrA.

L'analyse moléculaire du docking a révélé que parmi tous les dérivés, seuls 4 dérivés ont enregistré de bonnes valeurs de score d'amarrage (Tab 24). Ainsi, nous avons décrit en détail le mode d'interaction de ces molécules candidates avec les résidus du site actif de l'enzyme AgrA (Fig 48). Le composé 1(10), 11-Eremophiladien-9-ol est le composé le plus stable en comparaison aux autres molécules. Cette molécule a atteint une meilleure valeur d'amarrage par la valeur la plus basse (-5,630 kcal/mol). Cette stabilité peut être attribuée au nombre important de liaisons entre cette molécule et les résidus du site actif de l'enzyme (Fig 49).

Plus précisément, ce composé a formé six interactions au total: une interaction de liaison hydrogène entre le résidu GLU188 et le groupe hydroxyle (OH), deux interactions π -alkyle avec le résidu PHE182 par l'intermédiaire des atomes de carbone du composé et trois interactions alkyle-alkyle avec les résidus ILE143, LEU145 et LYS146.

Le composé ylangenal est très stable dans le site actif, car il a obtenu un score d'amarrage favorable (-5,291 kcal/mol). Cette composition a permis un total de cinq interactions avec les résidus dans la cavité de l'enzyme (Fig 49). Celles-ci comprenaient une interaction de liaison H entre le résidu LYS146 et l'atome d'oxygène du groupe aldéhyde (C=O), une interaction carbone-hydrogène avec le résidu GLU144 via l'atome de carbone de l'aldéhyde, et trois interactions alkyle-alkyle avec les résidus ILE143, LEU192 et LYS146. Le composé 4-terpinéol a créé une seule liaison H avec le résidu GLU144 via l'atome d'oxygène de son groupe hydroxyle (Fig 49). À l'inverse, l'eucalyptol a formé deux interactions alkyle-alkyle avec les résidus ILE143 et LYS146 (Fig 49).

Des études d'amarrage moléculaire ont révélé que la stabilité de ces molécules est attribuée à la présence d'atomes d'oxygène dans leurs structures moléculaires, favorisant la formation des interactions fortes, telles que des liaisons hydrogène H, avec les résidus du site actif.

II.4.1. Le profil ADMET des molécules bioactives des huiles essentielles (HEs)

II.4.1.1. Le profil d'ADMET des molécules bioactifs de l'HE de *S. molle*

L'évaluation du comportement pharmacocinétique des 20 molécules identifiées dans l'HE de *S. molle* et leur profil de similarité médicamenteuse ont été prédites par la détermination des propriétés ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) (Tab 25 et Tab 26).

Toutes les molécules respectaient la règle des cinq de Lipinski et *al.* (2001), suggérant des propriétés physicochimiques favorables pour les médicaments oraux. Le score de biodisponibilité était cohérent pour tous les composés (0,55), reflétant une biodisponibilité orale prédite modérée. Cependant, la plupart des molécules sélectionnées ont montré une faible absorption gastro-intestinale (GI) prédite, à l'exception des composés elemol, guaiol acetate et Tau-cadinol acetate, qui ont été classés comme hautement absorbables. L'absorption GI médiane de toutes les molécules était inférieure à 50 %, indiquant une biodisponibilité orale limitée pour la majorité. Les valeurs consensuelles de LogP variaient de 2,97 à 4,65, suggérant une lipophilie modérée à élever, qui favorise généralement la perméabilité membranaire. La plage de LogP indique que la plupart des composés devraient avoir une solubilité modérée à bonne, à l'exception de la *o*-Cymene, qui est connue pour être modérément soluble, ce qui limite potentiellement sa biodisponibilité.

La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été prédite pour la plupart des molécules, en particulier les entrées α -pinene, sabinene, β -myrcene, α -phellandrene, *o*-cymene, limonene, elemol, β -copaene, α -ylangene, guaiol acetate, Tau-cadinol acetate, ce qui suggère leur potentiel à pénétrer dans le système nerveux central (SNC). Aucun des composés n'a été identifié comme substrat de la P-glycoprotéine (P-gp), ce qui implique un faible risque de perte d'efficacité induite par efflux. Ceci est avantageux pour les applications au niveau du SNC ou systémiques. Les valeurs de perméabilité cutanée (Log Kp) variaient de -3,21 à -5,33 cm/s. Ces valeurs se situent dans la plage acceptée pour les agents thérapeutiques (Log Kp < -2,5). Ces molécules ne devraient pas pénétrer de manière excessive la barrière cutanée, ce qui est favorable pour des traitements systémiques.

Concernant le métabolisme, aucun des composés testés n'était susceptible d'inhiber le CYP3A4, enzyme responsable du métabolisme de plus de 50 % des médicaments commercialisés. En revanche, une inhibition du CYP2C9 a été observée pour la majorité des

composés à l'exception de certains composés spécifiques, tels que le sabinene, le β -myrcene et l'o-cymene. Parallèlement, une inhibition du CYP2C19 a été prédite dans plusieurs molécules à l'exception de l' α -pinene, le sabinene, le β -myrcene, l' α -phellandrene, l'o-cymene, le limonene, l'elemol, le guaiol acetate et le Tau-cadinol acetate. Par ailleurs, seul le composé o-cymene a inhibé le CYP2D6, ainsi qu'une inhibition du CYP1A2 a été observée par les composés α -gurjunene, β -copaene et α -ylangene, soulignant de possibles interactions médicamenteuses liées au métabolisme.

En termes de toxicité, bien que le tableau ne fournisse pas de valeurs explicites pour la DMR, la DL_{50} ou l'hépatotoxicité, aucune perméabilité cutanée ni inhibition du CYP3A4 n'a été détectée, suggérant ainsi une toxicité cutanée faible et une clairance métabolique sécurisée. Étant donné qu'aucun composé n'a été signalé comme substrat de la P-gp ou hépatotoxique, et en supposant qu'aucun n'était mutagène ou immunotoxique, le profil de sécurité semble acceptable.

Tableau25 : Caractéristiques ADME des molécules de l'huile essentielle de *S.molle*

Donnée	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Masse Moléculaire (g/mol)	136,23	136,23	136,23	136,23	134,22	136,23	204,35	204,35	204,35	204,35	204,35	204,35	204,35	204,35	204,35	222,37	204,35	204,35	264,40	264,40
Nombre d'atomes lourds	10	10	10	10	10	10	15	15	15	15	15	15	15	15	15	16	15	15	19	19
Nombre d'atomes lourds aromatiques	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fraction Csp3	0,80	0,80	0,40	0,60	0,40	0,60	0,60	0,87	0,73	0,60	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,87	0,87	0,82	0,82
Nombre de liaisons rotatives	0	1	4	1	1	1	3	0	0	0	1	0	1	1	1	3	1	1	3	3
Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2
Nombre de donneurs de liaison hydrogène	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Réfractivité molaire	45,22	45,22	48,76	47,12	45,99	47,12	70,42	67,14	68,78	70,42	69,04	68,78	69,04	69,04	69,04	72,10	67,14	67,14	80,45	80,45
TPSA Å ² (Surface polaire topologique)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,23	0,00	0,00	26,30	26,30
Log Po/w consensuel	3,44	3,25	3,43	2,97	3,54	3,37	4,65	4,35	4,24	4,26	4,17	4,13	4,07	4,18	4,14	3,77	4,40	4,30	3,89	3,89
Règle de Lipinski	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Score de biodisponibilité	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Absorption intestinale	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Fort	Faible	Faible	Fort
Pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BBB)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Substrat de P-gp	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur du CYP1A2	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Yes	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Yes	Yes	Non	Non
Inhibiteur du CYP2C19	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inhibiteur du CYP2C9	Yes	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inhibiteur du CYP2D6	Non	Non	Non	Non	Yes	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur du CYP3A4	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Log K _p (cm/s) Perméabilité cutanée	-3,95	-4,94	-4,17	-4,85	-4,01	-3,89	-3,21	-4,20	-4,44	-4,32	-4,49	-4,61	-4,65	-4,49	-4,85	-4,35	-4,20	-4,37	-5,33	-5,13

Tableau 26 : Etude de la toxicité du composé de l'huile essentielle de *S.molle*.

Composants	DL₅₀ (mg/kg) (Dose Létale 50)	Classe de toxicité	Effets toxiques prédits
α-Pinene	3700	5	Neurotoxicité (0,51) ; Barrière hémato-encéphalique (0,95) ; Écotoxicité (0,78) ; Cytochrome CYP2C9 (0,96).
Sabinene	5000	5	Neurotoxicité (0,57) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,69) ; Récepteur de la pregnane X (PXR) (0,50) ; Cytochrome CYP2C9 (0,64).
β-Myrcene	5000	5	Neurotoxicité (0,50) ; Cardiotoxicité (0,69) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,65) ; Facteur nucléaire de type 2 dérivé des érythroïdes/élément de réponse antioxydant (Nrf2/ARE) (1,0) ; Élément de réponse au facteur de choc thermique (HSE) (1,0) ; Récepteur de la pregnane X (PXR) (0,53) ; Cytochrome CYP2C9 (0,73).
α-Phellandrene	5700	6	Neurotoxicité (0,59) ; Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,73).
o-Cymene	1370	4	Neurotoxicité (0,68) ; Cancérogénicité (0,64) ; Barrière hémato-encéphalique (0,99) ; Écotoxicité (0,71) ; Cytochrome CYP2C9 (0,59).
Limonene	4400	5	Neurotoxicité (0,60) ; Cardiotoxicité (0,72) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,70).
β-Elemene	5000	5	Neurotoxicité (0,59) ; Barrière hémato-encéphalique (0,98) ; Écotoxicité (0,73) ; Cytochrome CYP2C9 (0,67).
α-Gurjunene	5000	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,63).
Caryophyllene	5300	5	Immunotoxicité (0,54) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,68) ;

Résultats et discussion

			Cytochrome CYP2C9 (0,67).
Humulene	3650	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,68) ; Cytochrome CYP2C9 (0,64)
γ-Muurolene	4400	5	Neurotoxicité (0,54) ; Immunotoxicité (0,55) ; Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,65) ; Cytochrome CYP2C9 (0,67).
β-Cyclogermacrane	5300	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,68) ; Cytochrome CYP2C9 (0,61).
α-Muurolene	4400	5	Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,66).
γ-Cadinene	4400	5	Neurotoxicité (0,54) ; Immunotoxicité (0,55) ; Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,65) ; Cytochrome CYP2C9 (0,67)
δ-Cadinene	4390	5	Neurotoxicité (0,50) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,65) ; Aromatase (0,53) ; Cytochrome CYP2C9 (0,65).
Elemol	2000	4	Barrière hémato-encéphalique (0,91) ; Écotoxicité (0,62) ; Cytochrome CYP2C9 (0,67)
β-copaene	4700	5	Neurotoxicité (0,53) ; Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,72) ; Cytochrome CYP2C9 (0,64)
α-ylangene	3700	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,72) ; Cytochrome CYP2C9 (0,63)
Guaiol acetate	4800	5	Barrière hémato-encéphalique (0,94) ; Écotoxicité (0,63) ; Récepteur GABA (GABAR) (0,53) ; Cytochrome CYP2C9 (0,52).
Tau-Cadinol acetate	4800	5	Toxicité respiratoire (0,53) ; Immunotoxicité (0,89) ; Barrière hémato-encéphalique (0,90) ; Écotoxicité (0,66) ; Récepteur GABA (GABAR) (0,62)

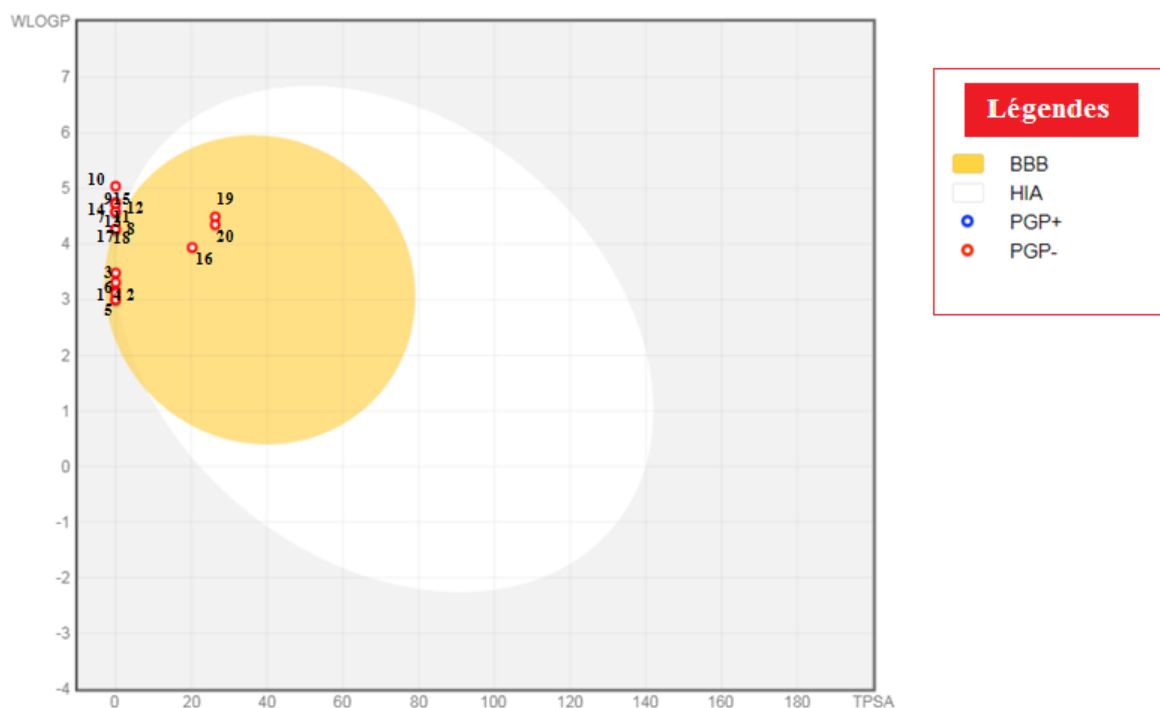


Figure 50 : Le modèle d'œuf de l'huile essentielle de *S. molle*.

Le modèle BOILED-Egg permet de prédire graphiquement l'absorption gastro-intestinale passive (AIP) et la pénétration cérébrale (BHE) des petites molécules à partir de deux paramètres physico-chimiques clés: la lipophilie (WLOGP) et la surface polaire topologique (TPSA). La zone blanche correspond aux molécules susceptibles d'être absorbées dans le tractus gastro-intestinal, tandis que la zone jaune désigne celles capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Les cercles rouges (PGP-) indiquent les composés qui ne sont pas des substrats de la glycoprotéine P, ce qui signifie qu'ils ne sont pas activement expulsés du système nerveux central (SNC), contrairement aux cercles bleus (PGP+), absents de ce diagramme, qui exposent les substrats de la glycoprotéine P (Figure 50).

La figure 51 présente la distribution hexagonale de plusieurs propriétés, telles que la lipophilie, la polarité, la taille, l'insaturation, l'insolubilité et la flexibilité, qui contribuent à la similarité médicamenteuse. La zone rose correspond à l'espace physicochimique approprié pour la biodisponibilité orale. La lipophile (LIPO), polarité (POLAR), insolubilité (INSOLU), insaturation (INSATU), flexibilité (FLEX). Le blanc de l'œuf dur représente le tube digestif, le jaune indique la barrière hémato-encéphalique, et le point bleu désigne les substances chimiques susceptibles d'être des substrats de la P-glycoprotéine sont représentées.



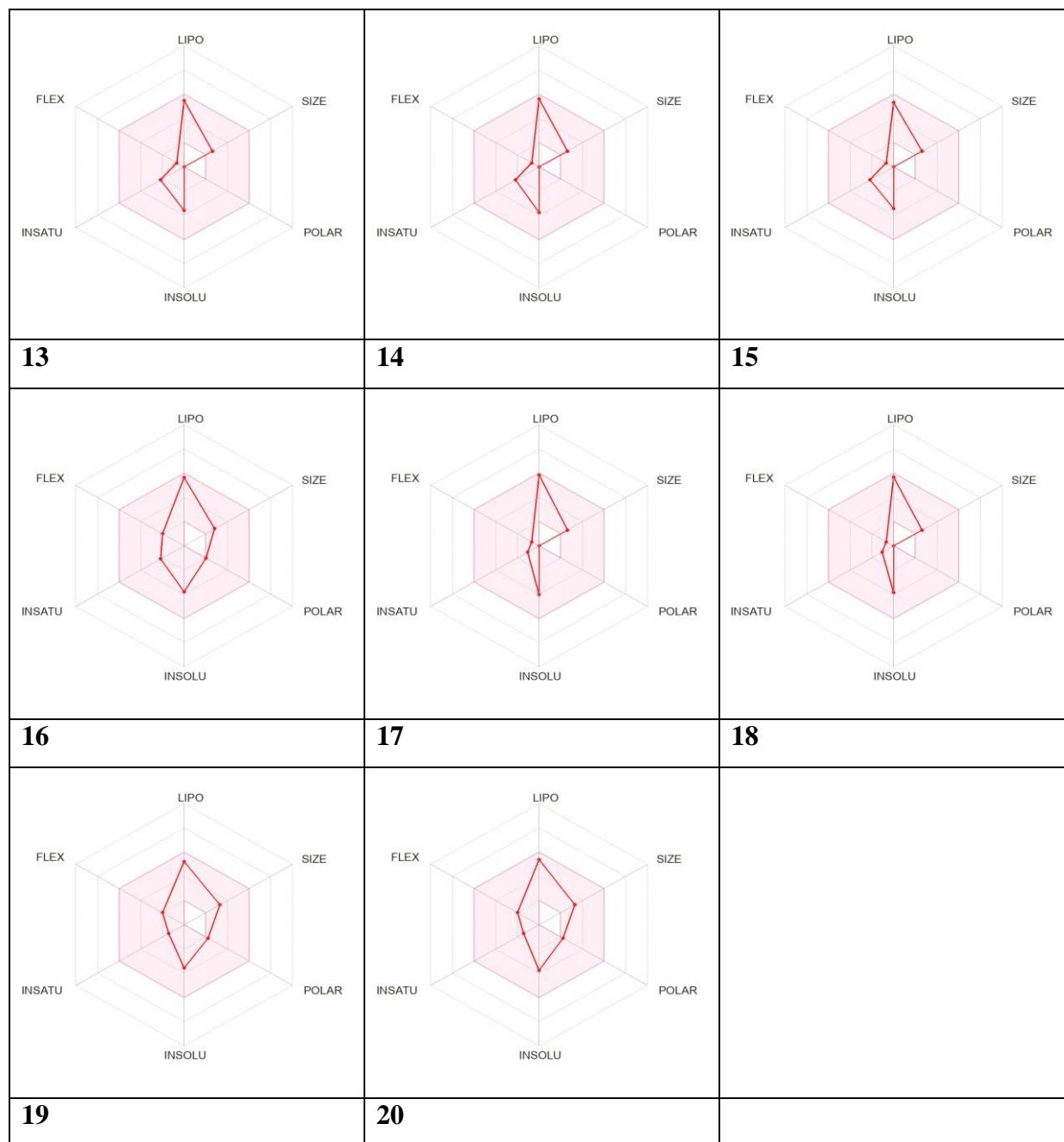


Figure 51 : Les polygones de biodisponibilité de l'huile essentielle de *S. molle* identifiant les constituants en fonction de leurs paramètres physico-chimiques en utilisant les caractéristiques ADMET.

II.4.1.2. Le profil d'ADMET des molécules bioactives de l'huile essentielle d'*E. globulus*

Les caractéristiques ADMET in silico des 14 composés identifiés dans l'HE d'*E. globulus* ont été étudiées (Tab 27 et Tab 28). Les composés sélectionnés présentaient un Log Po/w adéquat, compris entre 2,60 et 4,60. La règle de Lipinski et *al.* (2011) a été confirmée et des scores de biodisponibilité (0,55) ont été décrits. De même, les compositions identifiées ont exprimé d'excellentes valeurs (TPSA) inférieures à 125 Å². Ces résultats ont révélé que ces composés ne sont pas susceptibles d'être absorbés par voie orale. Contrairement aux autres molécules tels que, le 1,8-cinéole, le 4-terpinéol, le 1(10), 11-éremophiladién-9-ol et l'ylangénal qui présentaient une absorption gastro-intestinale élevée.

Tableau 27 : Caractéristiques ADME des molécules de l'huile essentielle d'*E.globulus*

Donnée	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Masse Moléculaire (g/mol)	136,23	136,23	134,22	136,23	154,25	136,23	136,23	154,25	204,35	204,35	204,35	220,35	204,35	218,33
Nombre d'atomes lourds	10	10	10	10	11	10	10	11	15	15	15	16	15	16
Nombre d'atomes lourds aromatiques	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fraction Csp3	0,80	0,60	0,40	0,60	1,00	0,60	0,60	0,80	0,87	0,87	0,73	0,73	0,60	0,80
Nombre de liaisons rotatives	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2
Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
Nombre de donneurs de liaison hydrogène	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Réfractivité molaire	45,22	47,12	45,99	47,12	47,12	47,12	47,12	48,80	67,14	67,14	68,78	69,94	70,68	67,34
TPSA Å ² (Surface polaire topologique)	0,00Å ²	0,00 Å ²	0,00 Å ²	0,00 Å ²	9,23 Å ²	0,00 Å ²	0,00 Å ²	20,23 Å ²	0,00 Å ²	0,00 Å ²	0,00 Å ²	20,23 Å ²	0,00 Å ²	17,07 Å ²
Log Po/w consensuel	3,44	3,35	3,54	3,37	2,67	3,35	3,40	2,60	4,34	4,34	4,12	3,49	4,60	3,40
Règle de Lipinski	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Score de biodisponibilité	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Absorption intestinale	Faible	Faible	Faible	Faible	Fort	Faible	Faible	Fort	Faible	Faible	Faible	Fort	Faible	Fort
Pénétration de la barrière hémato-encéphalique(Bbb)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Substrat de P-gp	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur du CYP1A2	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur du CYP2C19	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Inhibiteur du CYP2C9	Oui	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inhibiteur du CYP2D6	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur du CYP3A4	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Log K _p (cm/s) Perméabilité cutanée	-3,95	-3,94	-4,01	-3,89	-5,30	-3,94	-3,96	-4,93	-4,20	-4,20	-4,61	-4,84	-3,45	-4,98

Tableau28 : Etude de la toxicité des composés de l'huile essentielle d'*E. globulus*.

Composants	DL ₅₀ (mg/kg) (Dose Létale 50)	Classe de Toxicité	Effets toxiques prédits
α-pinene	3700 mg/kg	5	Écotoxicité (0,78) ; Barrière hémato-encéphalique (0,95) ; Neurotoxicité (0,51) ; Cytochrome CYP2C9 (0,69).
B-pinene	4700 mg/kg	5	Neurotoxicité (0,56) ; Écotoxicité (0,72) ; Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Cytochrome CYP2C9 (0,66).
O-Cymene	1370 mg/kg	4	Neurotoxicité (0,68) ; Cancérogénicité (0,64) ; Écotoxicité (0,71) ; Barrière hémato-encéphalique (0,99) ; Cytochrome CYP2C9 (0,59)
Limonene	4400 mg/kg	5	Neurotoxicité (0,6) ; Cardiotoxicité (0,72) ; Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,70)
Eucalyptol	2480 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,98) ; Écotoxicité (0,67)
γ -Terpinene	4390 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,62) ; Récepteur alpha des œstrogènes (ER) (1,0)
Terpinolene	4390 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,62) ; Récepteur alpha des œstrogènes (ER) (1,0) ; Cytochrome CYP2C9 (0,67)
4-Terpineol	1016 mg/kg	4	Barrière hémato-encéphalique (0,89) ; Écotoxicité (0,59) ; Cytochrome CYP2C9 (0,58)
Aromandendrene	5000 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,63)
Alloaromadendrene	5000 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,67) ; Cytochrome CYP2C9 (0,63)
(+)-B-Cyclogermacrene	5300 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,68) ; Cytochrome CYP2C9 (0,61)

Résultats et discussion

Germacrene B	4390 mg/ml	5	Barrière hémato-encéphalique (0,97) ; Écotoxicité (0,61) ; Cytochrome CYP2C9 (0,68)
1-Naphthalenol, 1.2.3.4.4a.5.6.7 -Octahydro- 4a.5-Dimethyl- 3-(1-Methylethenyl)-	2340 mg/kg	5	Neurotoxicité (0,65) ; Toxicité respiratoire (0,79) ; Barrière hémato-encéphalique (0,95) ; Écotoxicité (0,61) ; Toxicité clinique (0,51) ; Toxicité nutritionnelle (0,61) ; Récepteur GABA (GABAR) (0,85) ; Cytochrome CYP2C9 (0,75)
Ylangenal	2300 mg/kg	5	Barrière hémato-encéphalique (0,96) ; Écotoxicité (0,70) ; Récepteur GABA (GABAR) (0,50) ; Récepteur X des pregnanes (PXR) (0,50) ; Cytochrome CYP2C9 (0,62).

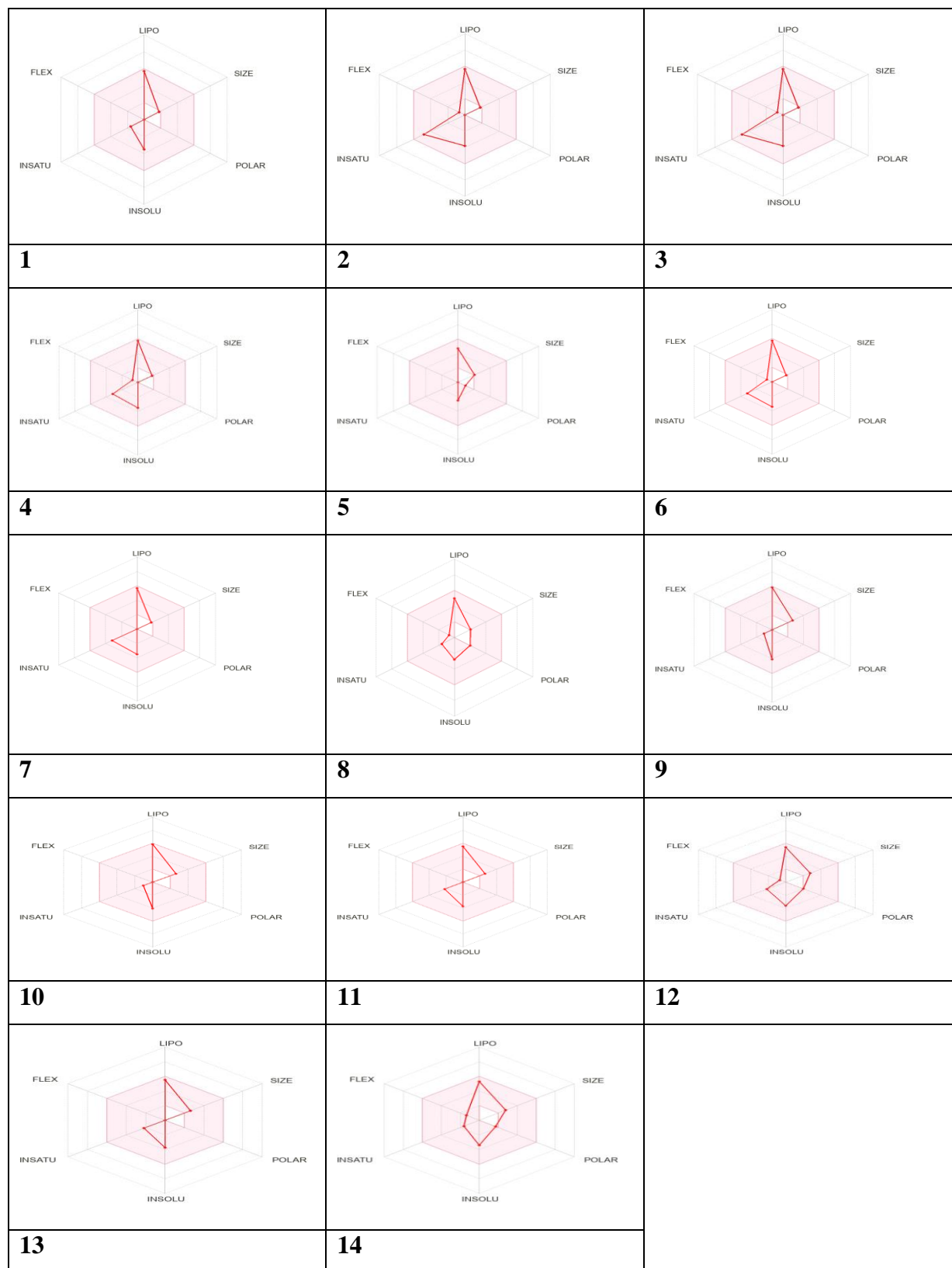


Figure 52: Les polygones de biodisponibilité de l'HE d'*E. globulus* identifiant les constituants, en fonction de leurs paramètres physico-chimiques en utilisant les caractéristiques ADMET.

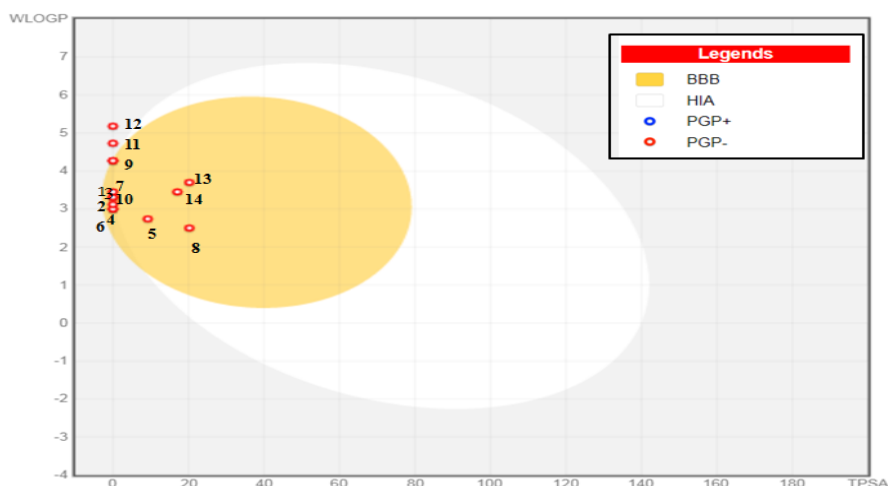


Figure 53 : Le modèle d'œuf de l'huile essentielle d'*E. globulus*

Le niveau de toxicité des composés de l'HE d'*E. globulus* a été prédit à l'aide de l'outil ProTox-II. Dans la présente étude, de nombreuses facettes de la toxicité ont été prises en compte, notamment : la neurotoxicité, l'écotoxicité, la barrière BHE, le cytochrome CYP2C9, la cancérogénicité, la cardiotoxicité, la toxicité respiratoire, la toxicité clinique, la toxicité nutritionnelle, le récepteur GABA, le récepteur alpha des œstrogènes et le récepteur X de la prégnane (Tab 28). Pour les classifications toxicité délimitées, les niveaux ont été appliquées comme suit : la classe I correspond aux substances mortelles en cas d'ingestion, la classe II regroupe également les composés mortels par ingestion, tandis que la classe VI est considérée comme non toxique. Ces catégories reflètent les différents degrés de toxicité associés aux substances étudiées (Mehta et *al.*, 2022).

Le tracé radar montre que tous les composés phytochimiques sélectionnés se situent à l'intérieur et à l'extérieur de la zone rose (Fig 52), indiquant leur similarité moyenne avec un médicament unique et un bon profil de biodisponibilité. De plus, la pharmacocinétique a été évaluée à l'aide de la méthode de l'œuf dur (Fig 53).

La majorité des molécules testées sont situées dans la région blanche de l'HIA, indiquant qu'elles sont supposées être absorbées dans l'intestin. Les molécules tels que le limonène, l'alloaromadendrène, le (+)-B-cyclogermacrane, le germacrène B et 1(10), le 11-éremophiladiène-9- se situent dans la région jaune de la BHE, suggérant qu'elles pourraient traverser la barrière hémato-encéphalique.

Discussion générale

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HEs) de *Schinus molle* et d'*Eucalyptus globulus* a montré que la concentration de 200 mg/mL produisait l'effet inhibiteur le plus marqué, sur l'ensemble des bactéries testées. L'huile essentielle d'*E. globulus* a démontré une activité notable contre les souches isolées et mutantes de *S. aureus*, tandis que l'huile de *S. molle* a présenté une inhibition particulièrement élevée pour les souches S03 et AgrB à la dose optimale de 200 mg/mL. Ces résultats confirment que l'efficacité antibactérienne dépend à la fois de la concentration appliquée et de la sensibilité spécifique de chaque souche.

En parallèle, les HEs ont montré un effet significatif sur le quorum sensing (QS), comme l'illustrent les inhibitions de la violacéine et de la staphyloxanthine. Pour *E. globulus*, cet effet était notable à des concentrations de 25 et 50 mg/mL, tandis que pour *S. molle*, l'inhibition la plus marquée a été observée à 200 mg/mL. À des concentrations plus faibles de *S. molle* (12,5–25 mg/mL), l'inhibition de la mobilité bactérienne restait modérée, alors qu'aux concentrations plus élevées (100 et 200 mg/mL), elle devenait très significative pour toutes les souches testées. De plus, les huiles essentielles ont entraîné une réduction significative de la production de polysaccharides extracellulaires (EPS), suggérant un impact direct sur la formation de biofilm et sur la régulation de la communication cellulaire.

Les résultats de Docking moléculaire confirment et complètent ces observations expérimentales. Tous les composés majeurs identifiés dans les HEs se sont révélés capables d'inhiber efficacement le récepteur cible AgrA, avec des affinités de liaison prometteuses. La stabilité des complexes ligand-récepteur est attribuée à la présence d'atomes d'oxygène dans les structures moléculaires, favorisant la formation de liaisons hydrogène avec les résidus du site actif. La concordance entre les résultats expérimentaux et *in silico* met en évidence la complémentarité des approches, renforçant la validité des composés testés comme inhibiteurs potentiels de l'opéron AgrA.

En résumé, ces données démontrent que les huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* possèdent un double potentiel : elles inhibent à la fois la croissance bactérienne et les mécanismes de virulence liés au quorum sensing. Cette synergie entre activité antibactérienne et anti-QS, corroborée par les études de Docking moléculaire, confirme leur intérêt en tant qu'agents antimicrobiens naturels alternatifs, capables de réduire la virulence bactérienne tout en limitant la sélection de résistances.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel de certaines molécules actives des huiles essentielles à interférer avec ces mécanismes, réduisant la virulence bactérienne indépendamment de leur effet antibactérien direct.

Les huiles essentielles de *Schinus molle* et d'*Eucalyptus globulus* présentent une composition chimique partiellement comparable certaines molécules bioactives, telles que l' α -pinène, O-cymène, Limonène et le β -Cyclogermacrane. Cette similitude dans la composition chimique pourrait expliquer la convergence de leurs effets antimicrobiens, particulièrement contre *Staphylococcus aureus*. Selon les travaux de Wang et al. (2019), l' α -pinène présente une activité antibactérienne notable contre *S. aureus*, avec une CMI de 0,420 mg/mL, traduisant une action plus marquée sur les bactéries Gram positives en raison de la plus grande perméabilité de leur paroi aux composés hydrophobes.

Parallèlement, Ložienė et al. (2018) ont révélé que l'efficacité biologique de l' α -pinène semble étroitement liée à sa configuration énantiomérique, la forme (+) étant reportée comme la plus active. Cette caractéristique structurale pourrait influencer sa capacité à interagir avec la protéine régulatrice AgrA, comme le suggèrent les résultats issus des simulations de docking moléculaire. Par ailleurs, d'autres composés présents dans l'huile essentielle tels que le limonène, le 1,8-cinéole et le β -myrcène, peuvent interagir avec l' α -pinène et influencer son action, entraînant des effets synergistiques ou en fonction de la nature des interactions chimiques (Ložienė et al., 2018). Dans ce contexte, la combinaison de molécules dans les huiles étudiées pourrait contribuer à potentialiser l'activité antivirulente globale observée dans nos essais in vitro, notamment par l'inhibition de la formation de biofilm et la réduction de la production de slime par *S. aureus*.

Borges et al. (2022) a rapporté que l' α -pinène possède des propriétés antibactériennes lorsqu'il est appliqué à certains micro-organismes et ils ont démontré que son efficacité dépend directement de sa concentration, de l'interaction avec certaines souches bactériennes et, dans certains cas, de l'action concomitante d'antibiotiques, agissant alors comme un agent synergique renforçant l'effet du médicament.

Des études récentes se sont spécifiquement intéressées à l'interaction entre l' α -pinène et divers antibiotiques, montrant que ce terpène pouvait renforcer l'activité antibactérienne de certains médicaments, tout en pouvant, dans certaines conditions, contribuer à une résistance croisée à d'autres agents antimicrobiens (Amaral et al., 2020). Par ailleurs, des recherches antérieures indiquent que l'énantiomère (+)- α -pinène présente une activité antibactérienne

mesurable contre *S. aureus* ATCC 25923, bien que cette action soit modérée, suggérant que l' α -pinène agit principalement comme inhibiteur de croissance plutôt que comme agent bactéricide, ce qui correspond à son potentiel d'effet antivirulent (De et al., 2018).

Dans ce cadre, les simulations de docking moléculaire confirment la capacité de l' α -pinène à se lier avec la protéine régulatrice AgrA de *S. aureus*, un élément clé impliquée dans le contrôle des gènes de virulence. Bien que son action directe sur la croissance bactérienne soit relativement limitée, l' α -pinène semble capable de réduire la pathogénicité de *S. aureus* en perturbant le système de signalisation du quorum sensing. Ces observations mettent en évidence le potentiel de ce composé, présent dans les huiles essentielles de *Schinus molle* et d'*Eucalyptus globulus*, comme agent antivirulent naturel prometteur, notamment dans la lutte contre les souches résistantes aux antibiotiques..

Dans ce contexte, nos résultats mettent en évidence que, outre l' α -pinène, d'autres constituants majeurs des huiles essentielles *Schinus molle* et d'*Eucalyptus globulus*, tels que le limonène, pourraient également contribuer à l'activité antibactérienne et antivirulente observée contre *S. aureus*. Le limonène, présent en proportion significative, pourrait agir de manière complémentaire à l' α -pinène, renforçant la capacité des huiles à perturber le système de quorum sensing et à inhiber la formation de biofilm. Ainsi, la combinaison de ces molécules bioactives pourrait expliquer l'effet synergique global de ces huiles, réduisant la pathogénicité des souches, même celles présentant une résistance aux antibiotiques.

Ces observations confirment l'importance du limonène dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et corroborent les travaux de Han et al. (2021), qui ont montré que ce composé exerce une activité significative contre *S. aureus*, avec une concentration minimale inhibitrice (MIC) de 20 mL/L. Selon ces auteurs, le limonène provoque la destruction de la paroi et de la membrane bactérienne, entraînant une fuite des protéines et acides nucléiques, une perte du potentiel membranaire et une perturbation des principales voies métaboliques respiratoires, notamment le cycle de Krebs (TCA) et la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). L'inhibition des enzymes clés (SDH, MDH, PK, ATPases) ainsi que la réduction de la production d'ATP traduisant une altération profonde de la fonction métabolique de la bactérie.

Pour approfondir ces mécanismes, les études de docking moléculaire ont été réalisées essentiellement pour élucider les mécanismes par lesquels les huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* interfèrent avec les voies de régulation de la virulence de *S. aureus*. Les résultats ont montré que les composés identifiés dans les deux huiles présentent une forte affinité de liaison avec AgrA, le principal régulateur transcriptionnel du système de quorum sensing (QS) chez *S. aureus*. Dans le cas de *S. molle*, des molécules telles que le Guaiol acetate, le β -copaène, gurjunene, tau-cadinol acetate, γ -Cadinene, humulene et l' α -murolene ont affiché des affinités de liaison élevées (\sim 7,5 kcal/mol), suggérant leur capacité à perturber efficacement les voies de signalisation médiatisées par AgrA. Ces composés interagissent avec des résidus hydrophobes clés comme Tyr229, Phe203 et Leu175, tout en formant des liaisons hydrogène avec des résidus tels que His200 et Thr166, stabilisant ainsi le complexe et empêchant AgrA d'activer l'expression des gènes de virulence.

De manière similaire, pour l'HE d'*E. globulus*, des composés tels que le 1(10),11-Eremophiladien-9-ol, le ylangenal, 4-terpineol et l'eucalyptol ont montré des résultats de modélisation prometteurs, avec des affinités de liaison suggérant leur capacité à inhiber la fonction d'AgrA. Ces composés forment des complexes stables avec des résidus clés d'AgrA, notamment Glu144 et Lys146, impliqués dans la signalisation du quorum sensing (QS). Ces observations *in silico* concordent avec les résultats expérimentaux *in vitro*, où l'huile d'*E. globulus* a démontré de fortes activités anti-QS et anti-biofilm. Ces études mettent en lumière le rôle crucial d'AgrA dans la régulation de la virulence de *S. aureus* et fournissent une compréhension mécanistique détaillée de la manière dont les composés des huiles essentielles peuvent perturber la communication et la pathogénicité bactériennes.

Collectivement, ces résultats soulignent le rôle prometteur des huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* comme agents naturels dans la lutte contre les infections à *S. aureus*, en particulier face aux souches résistantes aux antibiotiques. Par conséquent, ces huiles pourraient constituer une alternative ou un complément aux thérapies conventionnelles, ouvrant la voie à de futures études visant à exploiter leur potentiel thérapeutique et à développer des stratégies de contrôle innovantes contre les pathogènes résistants.

Pour conclure, les deux huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* ont montré des effets inhibiteurs remarquables. Cependant, l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* demeure la plus efficace, car elle inhibe la croissance et la virulence à de faibles concentrations.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La prévalence croissante de la résistance aux agents antimicrobiens à l'échelle mondiale est considérée comme l'un des défis les plus critiques de santé publique mondial d'une ampleur considérable, responsable de nombreuses pertes humaines chaque année. Face à cette situation, la recherche de solutions thérapeutiques alternatives s'impose comme une priorité. Parmi les bactéries concernées, *Staphylococcus aureus* occupe une place prépondérante en raison de sa grande capacité d'adaptation et de résistance, favorisant la survenue d'infections multiples et entraînant une morbidité et une mortalité particulièrement élevées.

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes médicinales aromatiques locales, *Schinus molle* et d'*Eucalyptus globulus*, sur six souches bactériennes isolées et cinq souches bactériennes mutées de *S. aureus*.

Le rendement en huile essentielle (HEs) obtenu à partir des feuilles d'*E. globulus* (1,87 %) s'est avéré nettement supérieur à celui de *S. molle* (0,71 %). Cette différence peut être attribuée à la variabilité interspécifique, à la nature des tissus foliaires ainsi qu'à la richesse en glandes sécrétrices d'huiles essentielles.

L'analyse chromatographique des HEs par GC-MS a mis en évidence une grande diversité de constituants, avec le limonène et l'eucalyptol identifiés comme composés principales et majoritaires chez *Schinus molle* et *Eucalyptus globulus*, respectivement.

Bien que l'analyse chromatographique ait montré que HEs des deux espèces présentent des profils chimiques présentant certaines similitudes, les variations qualitatives et quantitatives observées se répercutent directement sur l'efficacité de leurs activités antibactériennes respectives propre à chaque espèce. En effet, la nature et la proportion des composés majoritaires, tels que le limonène, l' α -pinène, jouent un rôle déterminant dans leurs propriétés antimicrobiennes. Ainsi, l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces HEs constitue une étape essentielle pour mieux comprendre le lien entre leur composition chimique et leur potentiel thérapeutique à activité antibactérienne contre *S. aureus*, ainsi que de rechercher les molécules impliquées dans cette activité.

L'étude comparative de l'activité antibactérienne des HEs de *S. molle* et *E. globulus* a montré que la concentration de 200 mg/mL produisait l'effet inhibiteur le plus marqué, en particulier sur la souche S01, et entraînait une inhibition significative de la croissance pour l'ensemble des bactéries testées.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus avec l'huile essentielle d'*E. globulus* révèlent une activité antibactérienne notable ($p < 0,01$), aussi bien contre les souches isolées que mutantes de *S. aureus*, et ce, pour toutes les concentrations testées. Par contre, l'huile essentielle de *S. molle* a présenté une activité antibactérienne significative ($p < 0,01$) contre toutes les souches évaluées, spécialement, les souches S03 et AgrB ont montré la plus grande sensibilité.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré que les deux huiles essentielles exercent un effet inhibiteur significatif contre les souches de *S. aureus* testés, avec une efficacité dépendant à la fois de la concentration appliquée et de la sensibilité spécifique de chaque souche de *S. aureus*.

Parallèlement, le Docking moléculaire a révélé une excellente interaction entre les composés chimiques détectés, ciblant certaines enzymes connues impliquées dans les activités QS. Ces résultats ont mis en évidence l'intérêt potentiel des HES de *S. molle* et d'*E. globulus* contre *S. aureus*, et le blocage des facteurs favorisant l'infection régulés par le mécanisme QS.

Ainsi, la concordance entre les résultats expérimentaux et ceux issus du Docking moléculaire met en évidence la complémentarité des approches *in vitro* et *in silico*, renforçant la validité des composés étudiés comme inhibiteurs potentiels de l'opéron AgrA et soulignant leur intérêt pour le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont montré que l'ensemble des composés identifiés présentent une capacité marquée à inhiber le récepteur cible AgrA, en affichant des affinités de liaison particulièrement prometteuses. Les données issues du docking moléculaire sont en accord avec les observations expérimentales, suggérant que les altérations génétiques liées au système Agr accentuent la sensibilité à l'action des huiles essentielles et confirmant ainsi le potentiel inhibiteur de ces molécules vis-à-vis de l'opéron AgrA.

Par ailleurs, les analyses d'amarrage moléculaire ont mis en évidence que la stabilité des complexes formés est largement due à la présence d'atomes d'oxygène dans les structures chimiques des composés testés. Ces derniers favorisent la formation d'interactions fortes, notamment des liaisons hydrogène (H), avec les résidus du site actif de la protéine, contribuant ainsi à la stabilité et à l'efficacité de la liaison ligand-récepteur.

Conclusion et perspectives

Ces résultats suggèrent que les huiles essentielles de ces deux espèces peuvent constituer des alternatives naturelles prometteuses face à la résistance croissante aux antibiotiques conventionnels

En somme, les données obtenues suggèrent que les HEs de ces deux espèces possèdent un potentiel thérapeutique prometteur pouvant être exploité dans la recherche de nouvelles alternatives face à la résistance croissante aux antibiotiques conventionnels

Ainsi, les résultats obtenus ouvrent la voie à plusieurs perspectives intéressantes pour de futures recherches :

- Basant sur les analyses in vitro et de l'étude in Silico, des huiles essentielles de *S. molle* et d'*E. globulus* étudiée qui exercent une activité antibactérienne, anti QS et antivirulence, des études in vivo et des expérimentations ciblées sont nécessaires pour confirmer ces résultats obtenus.

- Confirmé les résultats in Silico par l'isolement des composants de l'HE et les testé individuellement et en synergie pour bien déterminer les molécules responsables de l'activité biologique et leurs modes d'action.

- Enfin, des applications pratiques dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire.

Références bibliographique

Références bibliographiques

Amal B, Chourouk F, Nada F. Appréciation de l'activité antibactérienne d'une variété de propolis sur des *Staphylococcus aureus* isolés de la pathologie infectieuse [thèse de doctorat]. Tébessa (Algérie) : Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi ; 2024.

Abdelli W. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris* [Thèse de doctorat]. Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem ; 2017.

Abdel-Sattar E, Zaitoun AA, Farag MA, El Gayed SH, Harraz FM. Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Nat Prod Res.* 2010;24(3):226–35.

Abderrahim A, Belhamel K, Chalard P, Figuéredo G. Correlation between chemical composition and antioxidant activity of the essential oils from leaves and berries of *Schinus molle* L. growing in two areas of Bejaia (Algeria). *J Food Meas Charact.* 2018;12(2):1123-34.

Abraham SVP, Palani A, Ramaswamy BR, Shunmugiah KP, Arumugam VR. Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. *Arch Med Res.* 2011;42:658–68.

Adonizio AL, Downum K, Bennett BC, Mathee K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol.* 2006;105(3):427–35. doi: 10.1016/j.jep.2005.11.025.

Agatonovic-Kustrin S, Ristivojevic P, Gegechkori V, Litvinova TM, Morton DW. Essential oil quality and purity evaluation via FT-IR spectroscopy and pattern recognition techniques. *Appl Sci.* 2020;10(20):7294.

Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins (Basel).* 2021;13(10):677. doi: 10.3390/toxins13100677.

Ait Benlabchir A, Fikri-Benbrahim K, Moutawalli A, Alanazi MM, Halmoune A, Benkhoulil FZ, et al. GC–MS characterization and bioactivity study of *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) essential oils and their fractions: antibacterial and antioxidant properties and molecular docking modeling. *Pharmaceuticals.* 2024;17:1552. doi: 10.3390/ph17111552.

Ait Ouazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric*. 2011;91(14):2643-51.

Ajayi C, Åberg E, Askarian F, Sollid JUE, Johannessen M, Hanssen AM. Genetic variability in the *sdrD* gene in *Staphylococcus aureus* from healthy nasal carriers. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):57. doi: 10.1186/s12866-018-1179-7.

Alemayehu T. Prevalence of multidrug-resistant bacteria in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;26:133-9. doi: 10.1016/j.jgar.2021.05.017.

Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential Oils Used in Aromatherapy: A Systemic Review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5(8):601–11.

AlMatar M, Albarri O, Makky EA, Köksal F. Efflux pump inhibitors: New updates. *Pharmacol Rep*. 2021;73:1–16.

Alorabi M, Ejaz U, Khoso BK, Uddin F, Mahmoud SF, Sohail M, et al. Detection of Genes Encoding Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Pyoderma Patients. *Genes*. 2023;14(4):783. doi: 10.3390/genes14040783.

AlSheikh HMA, Sultan I, Kumar V, Rather IA, Al-Sheikh H, Tasleem Jan A, et al. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(8):480. doi: 10.3390/antibiotics9080480.

Amaral FLE, Farias TC, Brito RC, Melo TR, Ferreira PB, Lima ZN, et al. Effect of the Association and Evaluation of the Induction to Adaptation of the (+)-alpha-pinene with Commercial Antimicrobials against Strains of *Escherichia coli*. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(26):2300–7.

Amini R, Abdulmir AS, Ling BP, Jahanshiri F, Hematian A, Zargar M, et al. Isolation and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from keys of college students using different detection methods. *Br Biotechnol J*. 2011;2(1):13–25.

Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc.* 2016;181(1):1–20. doi: 10.1111/boj.12385.

Asfour HZ. Anti - Quorum Sensing Natural Compounds. *JMAU.* 2018;1(1):1–10. doi: 10.4103/JMAU.JMAU.

Atmani-Merabet G, Belkhiri A, Dems MA, Lalaouna A, Khalfaoui Z, Mosbah B. Chemical composition, toxicity, and acaricidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil from Algeria. *Curr Issues Pharm Med Sci.* 2018;31(2):89-93.

Aubourg M, Pottier M, Léon A, Paccoud O, Duclos G, Morand P, et al. Inactivation of the response regulator AgrA has a pleiotropic effect on biofilm formation, pathogenesis and stress response in *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiol Spectr.* 2022;10(1):e0159821.

Babab Aissa F. Encyclopedie des plantes utilisées (flore d'Algerie et du Maghreb). Rouiba (Alger) : Librairie moderne Rouiba ; 2000.

Bachir RG, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2(9):739-42.

Barbosa LC, Demuner AJ, Clemente AD. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Quim Nova.* 2007;30(8):1959-65.

Barbosa LCA, Filomeno CA, Teixeira RR. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. *Molecules.* 2016;21(12):1671.

Bardelang P, Murray EJ, Blower I, Zandomenighi S, Goode A, Hussain R, et al. Conformational analysis and interaction of the *Staphylococcus aureus* transmembrane peptidase AgrB with its AgrD propeptide substrate. *Front Chem.* 2023;11:1113885. doi: 10.3389/fchem.2023.1113885.

Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *J Prod Commun.* 2009;4(8):1147-54.

Baser KHC, Ku'rkcu'oglu M, Demirc'akmak B, U'lker N, Beis SH. Composition of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Turkey. J Essent Oil Res. 1997;9(6):693–6.

Batista DG, Sganzerla WG, da Silva LR, Vieira YGS, Almeida AR, Dominguni D, et al. Antimicrobial and cytotoxic potential of *Eucalyptus* essential oil-based nanoemulsions for mouthwashes application. Antibiotics (Basel). 2024;13(1):942.

Beavers WN, Skaar EPJ. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. Pathog Dis. 2016;74(6):ftw060.

Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):185–230.

Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol. 2004;186(14):4665-84.

Bégué P, Astruc J. Pathologie infectieuse de l'enfant. Paris : Masson ; 1999. 612 p.

Belhoussaine O, El Kourchi C, Harhar H, Bouyahya A, El Yadini A, Fozia F, et al. Chemical composition, antioxidant, insecticidal activity, and comparative analysis of essential oils of leaves and fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. Evid Based Complement Alternat Med. 2022;2022:4288890. doi: 10.1155/2022/4288890.

Belkhodja H, Bouhadi D, Medjadel B, Brakna A. Physicochemical characterization and evaluation of the antioxidant activities of essential oil extracted from *Eucalyptus globulus*. Eur J Biol Res. 2021;11(3):315-24.

Ben Hassine D, Abderrabba M, Yvon Y, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, et al. Chemical Composition and in Vitro Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Eucalyptus gillii* Essential Oil and Extracts. Molecules. 2012;17(8):9540-58.

Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA. Complete Nucleotide Sequence of pSK41: Evolution of Staphylococcal Conjugative Multiresistance Plasmids. J Bacteriol. 1998;180(17):4650-9.

Bhakhil S, Tranum-Jensen J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1991;173(23):7414-23.

Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int.* 2022;2022:5419874. doi: 10.1155/2022/5419874.

Bindu BSC, Mishra DP, Narayan B. Inhibition of Virulence of *Staphylococcus aureus* - a Food Borne Pathogen - by Squalene, a Functional Lipid. *J Funct Foods.* 2015;18:224–34.

Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2014;9(10):1165–77.

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42–51.

Borges MFA, Lacerda RS, Correia JPA, de Melo TR, Ferreira SB. Potential Antibacterial Action of α -Pinene. *Med Sci Forum.* 2022;12(1):11. doi: 10.3390/eca2022-12709.

Boukhatem MN, Amine FM, Kameli A, Saidi F, Walid K, Mohamed SB. Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) origin. *Int Lett Chem Phys Astron.* 2014;17:109-19.

Boukraâ D, Kiari FZ, Kerdal L, Rguieg F. Drying methods affect the extracts and essential oil of *M. aquatica* L. *Food Biosci.* 2021;41(11):101007. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101007.

Boulekbache-Makhlouf L, Meudec E, Chibane M, Mazauric JP, Slimani S, Henry M, et al. Analysis by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *J Agric Food Chem.* 2010;58(24):12615–24.

Bounaas K, Bouzidi N, Daghbouche Y, Garrigues S, de la Guardia M, El Hattab M. Essential Oil Counterfeit Identification through Middle Infrared Spectroscopy. *Microchem J.* 2018;139:347–56.

Bourachouche K, Boudei A. Physicochemical characterization of edible vegetable oils [Mémoire de Master]. Bejaia : University of Bejaia ; 2017. 42 p.

Bourakna Z, Righi K, Righi FA. GC/MS analysis of *Eucalyptus globulus* L. (Myrtaceae) leaves essential oil from Algeria and their insecticidal activity against adults of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera; Tephritidae). J Essent Oil Bear Plants. 2022;25(4):876–87.

Bouras M, Abbaci NB, Bennadja S. Antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2016;8(11):1717–21.

Bourinbaïar AS, Coleman CF. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro. Arch Virol. 1997;142(11):2225-35.

Bouyahya A, Et-Touys A, Bakri Y, Talbawi A, Fellah H, Abrini J et al (2017) Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microb Pathog 1(111):41–49

Bras C, Domínguez S, Codón S, Minetti A, Ferrero A. Consequences of subchronic exposure to ethanolic extract from fruits and leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in mice. J Ethnopharmacol. 2010;132(1):321-7.

Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. Cell. 2000;103(7):1143–54. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00216-6.

Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel). 2010;2(5):1148–65. doi: 10.3390/toxins2051148.

Bush K, Bradford PA. B-lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(9):a025247. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

Bush NG, Evans-Roberts K, Anthony M. DNA topoisomerases. EcoSal Plus. 2015;6(2):1–34. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014.

Byarugaba DK. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. Int J Antimicrob Agents. 2004;24(2):105-10. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.02.015.

Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tohrAMYcin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene*. 1989;81(2):327-33.

Cai J, Yang D, Zhang J, Guo J, Jiang L. Evaluation of bio-guided fraction from *Laminaria japonica* as a natural food preservative based on antimicrobial activity. *Food Meas Charact*. 2020;14(5):3061–8.

Celeiro M, Lamas JP, Arcas R, Lores M. Antioxidants Profiling of By-Products from *Eucalyptus* Greenboards Manufacture. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8):263.

Cermelli A, Fabio A, Fabio G, Quaglio P. Effect of *Eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol*. 2008;56(1):89-92.

Cervantes-Ceballos L, Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J. Repellent and anti-quorum sensing activity of six aromatic plants occurring in Colombia. *Nat Prod Commun*. 2015;10(10):1777-80.

Chabbert YA. Sensibilité bactérienne aux antibiotiques. In: Le Minor L, Véron M, editors. *Bactériologie Médicale*. Paris : Flammarion Médecine Sciences ; 1982. p. 204-12.

Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629–41. doi: 10.1038/nrmicro2200.

Chancey ST, Zähler D, Stephens DS. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol*. 2012;7(8):959–78.

Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):105–8.

Chebaibi A, Marouf Z, Rhazi-Filali F, Fahim M, Ed-Dra A. Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*. 2016;14(6):355-62.

Chen K, Peng CT, Chi F, Yu CD, Yang QL, Li ZJ. Antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against *Yersinia enterocolitica*. *Front Microbiol*. 2022;13:885092. doi: 10.3389/fmicb.2022.885092.

Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence. 2021;12(1):547-69.

Chevalier A. Travaux français sur le genre *eucalyptus*. J Agric Tradit Bot Appl. 1952;32:357-8.

Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloy MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(5):698–722.

Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. Cell. 2014;159(6):1300–11. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.017.

Clarke SR, Andre G, Walsh EJ, Dufrêne YF, Foster TJ, Foster SJ. Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. Infect Immun. 2009;77(6):2408-16.

Clarke SR, Foster SJ. IsdA protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. Infect Immun. 2008;76(4):1518-26.

Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz FJ. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. Infect Immun. 2006;74(8):4950–3.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard (Twelfth Edition). Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2015. 364 p. Available from: https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf.

Cloeckaert A, Zygmunt MS, Doublet B. Editorial: Genetics of Acquired Antimicrobial Resistance in Animal and Zoonotic Pathogens. Front Microbiol. 2017;8:2428. doi: 10.3389/fmicb.2017.02428.

Čmiková N, Galovičová L, Schwarzová M, Vukic MD, Vukovic NL, Kowalczewski ŁP, et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Eucalyptus globulus* Essential Oil. Plants (Basel). 2023;12(5):1076. doi: 10.3390/plants12051076.

Cornforth DM, Foster KR. Antibiotics and the art of bacterial war. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(35):10827–8.

Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 2007;153(8):2435-46.

Courvalin P, Denis F, Ploy MC, de Garilhe MP, Trieu-Culot P. Antibiotiques. *In* : Encyclopædia Universalis [En ligne]. 2001 [cité 2013 Mai 24]. Disponible sur : <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.

Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, et al. A-hemolysin, not panton-valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Infect Dis*. 2014;209(11):1773–80. doi: 10.1093/infdis/jit840.

Cribier B, Piemont Y, Grosshans E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30(2):319–24. doi: 10.1016/S0190-9622(94)70032-X.

Cutro AC, Coria MS, Bordon A, Rodriguez SA, Hollmann A. Antimicrobial properties of the essential oil of *Schinus areira* (Aguaribay) against planktonic cells and biofilms of *S. aureus*. *Arch Biochem Biophys*. 2023;744:109670.

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417–33.

De Elguea-Culebras GO, Bravo EM, Sánchez-Vioque R. Potential Sources and Methodologies for the Recovery of Phenolic Compounds from Distillation Residues of Mediterranean Aromatic Plants. An Approach to the Valuation of by-Products of the Essential Oil Market—A Review. *Ind Crops Prod*. 2022;175:114261.

de Sousa Eduardo L, Farias TC, Ferreira SB, Ferreira PB, Lima ZN, Ferreira SB. Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of α -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(11):917-24.

de Souza Feitosa Lima IM, Zagmignan A, Santos DM, Dantas AT, Albuquerque LMA, Freire-de-Lima L, et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action

and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. *Sci Rep*. 2019;9(1):18159.

Decousser JW, Pozzetto B, Romano-Bertrand S. Antibiotiques et résistances : épisode 2, les antibiotiques autres que les bêtalactamines. *Hygiènes*. 2025;33(2):149-60.

Dehoffman E, Charrette J, Strooban V. Spectrométrie de masse. Paris : Masson ; 1994. 341 p.

Derwich E, Benziane Z, Boukir A. GC/MS analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Adv Nat Appl Sci*. 2009;3(3):305–14.

Derwich E, Benziane Z, Manar A, Boukir A, Taouil R. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *origanum vulgare* from Morocco. *J Essent Oil Bear Plants*. 2010;13(4):460-70.

Desai R, Pannaraj PS, Agopian J, Jhaveri N, Goldstein M, Mascola L. Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fomites. *Am J Infect Control*. 2011;39(3):219–25.

Deveci O, Sukan A, Tuzun N, Kocabas EEH. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *J Med Plants Res*. 2010;4(21):2211-6.

Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: A review. *J Sci Food Agric*. 2018;98(3):833–48.

Dhakarwal P, Bhalothia SK, Singhal V, Sharma S, Kataria AK. Detection of *icaA* and *icaD* genes in slime producing *Staphylococcus aureus* isolates from buffaloes with subclinical mastitis. *J Vet Res*. 2024;68(1):68-75.

Dhakarwal P, Bhalothia SK, Singhal V, Sharma S, Kataria AK. Detection of *icaA* and *icaD* genes in slime producing *Staphylococcus aureus* isolates from buffaloes with subclinical mastitis. *Int J Vet Sci Anim Husbandry*. 2024;9(1):747-50. doi: 10.22271/veterinary.2024.v9.i1j.970.

Divyakolu S, Chikkala R, Ratnakar KS, Sritharan V. Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. *Adv Infect Dis*. 2019;9(2):80–104.

Djellouli M, Ziane L, Elhendi H. Essential oil composition and antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* from Southwest Algeria. *Stud Eng Exact Sci*. 2024;5(2):e11057. doi: 10.54021/seesv5n2-560.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(6):2950–8.

do Rosário Martins M, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):485-92.

Dos Santos Cavalcanti A, de Souza Alves M, da Silva LCP, dos Santos Patrocínio D, Sanches MN, de Almeida Chaves DS, et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. *Rev Bras Farmacogn*. 2015;25(4):356-62.

Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: Structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(9):523–39.

Duletić-Laušević S, Alimpić-Aradski A, Živković J, Gligorijević N, Šavikin K, Radulović S, et al. Evaluation of bioactivities and phenolic composition of extracts of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) collected in Montenegro. *Bot Serb*. 2019;43(1):47-58.

Dumortier D. Contribution à l'amélioration de la qualité de l'huile essentielle d'ylangylang (*Cananga odorata* (Lamarck) J.D. Hooker et Thomson, variété genuina) des Comores [Thèse de doctorat]. Gembloux (Belgique) : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux ; 2006.

Duval M, Cossart P. A new mechanism of antibiotic resistance: ribosome recycling. *Med Sci (Paris)*. 2019;35(8-9):613-5.

Dzimitrowicz A, Jablonska-Strozek I, Gawryluk A, Krysinski J, Wróbel R. Comparison of the characteristics of gold nanoparticles synthesized using aqueous plant extracts and natural

plant essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. Arab J Chem. 2019;12(8):4795-805.

El Guerrouj B, Taibi M, Elbouzidi A, Bouhassoun S, Loukili EH, Moubchir T, et al. The effect of altitude on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils. Trop J Nat Prod Res. 2023;7(4):5279–85.

El Orche A, El Mrabet A, Said AAH, Mousannif S, Elhamdaoui O, Ansari SA, et al. Integration of FTIR spectroscopy, volatile compound profiling, and chemometric techniques for advanced geographical and varietal analysis of Moroccan *Eucalyptus* essential oils. Sensors (Basel). 2024;24(23):7337.

Elangovan S, Mudgil P. Antibacterial properties of *Eucalyptus globulus* essential oil against MRSA: A systematic review. Antibiotics (Basel). 2023;12(3):474. doi: 10.3390/antibiotics12030474.

Elansary HO, Salem MZM, Ashmawy NA, Yessoufou K, El-Settawy AAA. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. Leaf extracts related to phenolic composition. Nat Prod Res. 2017;31(24):2927–30.

Erazo S, Delporte C, Negrete R, Garcia R, Zaldivar M, Ittura G, et al. Constituents and biological activities of *Schinus molle* L. J Ethnopharmacol. 2006;107(3):395-400.

Erenler R, Pabuccu K, Yaglioglu AS, Demirtas I, Gul F. Chemical constituents and antiproliferative effects of cultured *Mougeotia nummuloides* and *Spirulina major* against cancerous cell lines. Z Naturforsch C. 2016;71(3-4):87–92.

Eryigit T, Yildirim B, Ekici K, Çirka M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Schinus molle* L. essential oil from Turkey. J Essent Oil Bear Plants. 2017;20(2):570-7.

Esnault C, Dulermo T, Smirnov A, Askora A, David M, Deniset-Besseau A, et al. Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. Sci Rep. 2017;7:200.

Ferdinand AS, McEwan C, Lin C, Betham K, Kandan K, Tamolsaian G, et al. Development of a crosssectoral antimicrobial resistance capability assessment framework. *BMJ Glob Health*. 2024;9:e013280.

Farag SF. Polyphenolic compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Bull Pharm Sci*. 2008;31(2):319–29.

Farsi R, Alaidaroos B. Antibacterial activity of *Eucalyptus* essential oil loaded on silica dioxide nanoparticles (SiNPs) against some pathogenic bacteria. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*. 2022;12(5):29–37.

Feriani A, Tir M, Hamed M, Sila A, Nahdi S, Alwasel S, et al. Multidirectional insights on polysaccharides from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: Physicochemical and functional profiles, in vitro antioxidant, anti-genotoxicity, antidiabetic, and antihemolytic capacities, and in vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive properties. *Int J Biol Macromol*. 2020;165(Pt B):2576-87.

Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Res Med Microbiol*. 2013;24(1):7–17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.

Fernández-Villa D, Jiménez Gómez-Lavín M, Abradelo C, San Román J, Rojo L. Tissue Engineering Therapies Based on Folic Acid and Other Vitamin B Derivatives. Functional Mechanisms and Current Applications in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):4068.

Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014;6(2):466–88.

Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Front Microbiol*. 2018;9:436. doi: 10.3389/fmicb.2018.00436.

Fleming A. Penicillin. Nobel Lecture. 1945 Dec 11. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49-62.

Foster TJ. The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends Microbiol*. 2019;27(11):927-41.

Foti C, Piperno A, Scala A, Giuffrè O. Oxazolidinone antibiotics: chemical, biological and analytical aspects. *Molecules*. 2021;26(14):4280. doi: 10.3390/molecules26144280.

Fowler B. The Folate Cycle and Disease in Humans. *Kidney Int*. 2001;59(Suppl 78):S221–9.

François P, Schrenzel J, Götz F. Biology and regulation of staphylococcal biofilm. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5218. doi: 10.3390/ijms24065218.

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989;42(8):872–4. doi: 10.1136/jcp.42.8.872.

Gad HA, Hamza AF, Abdelgaleil SAM. Chemical composition and fumigant toxicity of essential oils from ten aromatic plants growing in Egypt against different stages of confused flour beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. *Int J Trop Insect Sci*. 2022;42(1):697–706.

Gajdács M. Taxonomy and nomenclature of bacteria with clinical and scientific importance: current concepts for pharmacists and pharmaceutical scientists. *Acta Pharm Hung*. 2020;89(3):99-108.

Garima K, Saurabh S, Ashok E. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2018;34(1):46–50.

GBIF. *Eucalyptus globulus*. Occurrence gallery — taxon_key = 3176787 [Internet]. 2025 [cited 2025 Nov 22]. Available from: https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=3176787.

GBIF. *Schinus molle*. GBIF occurrence gallery — taxon_key = 3190642 [Internet]. 2025 [cited 2025 Nov 22]. Available from: https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=3190642.

Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2010;192(22):5663-73.

George NP, Wei Q, Shin PK, Konstantopoulos K, Ross JM. *Staphylococcus aureus* adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to immobilized platelets demonstrates shear-dependent behavior. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(10):2394-400.

Getaneh A. *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: A Literature Review. Clin Lab. 2021;67(9):1753-62.

Gherdaoui D, Yahoum MM, Toumi S, Bouacem T, Bendjeddou S, Merabet K, et al. Elucidating Chiral Resolution of Aromatic Amino Acids Using Glycopeptide Selectors: A Combined Molecular Docking and Chromatographic Study. Int J Mol Sci. 2024;25(16):9120.

Gnanamani A, Hariharan P, Paul-Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. Front Staphylococcus aureus. 2017;4(28):10-5772.

Godzaridis E. Modélisation bio-informatique du mécanisme d'action d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse du peptidoglycane [Mémoire de Maîtrise]. Québec : Université Laval ; 2012.

Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG, Davies J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(26):17025–30.

Goldbeck J, do Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini ÂM, da Silva WP. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. Ind Crops Prod. 2014;60:304-9.

Gomes V, Agostini G, Agostini F, Santos dos ACA, Rossato M. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). Biochem Syst Ecol.¹ 2013;48:222–7.

Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.² Nat Med. 2004;10(8):842-8.

Gordon CP, Olson SD, Lister JL, Kavanaugh JS, Horswill AR. Truncated autoinducing peptides as antagonists of *Staphylococcus lugdunensis* quorum sensing.³ J Med Chem. 2016;59(19):8879–88. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00727.

Goulian M, Bleile BM, Dickey LM, Grafstrom RH, Ingraham HA, Neynaber SA, et al. Mechanism of Thymineless Death. In: Nyhan WL, Thompson LF, Watts RWE, editors. Purine and Pyrimidine Metabolism in Man V. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York (NY): Springer; 1986. p. 89–95.

Grattapaglia D, Vaillancourt RE, Shepherd M, Thumma BR, Foley W, Külheim C, et al. Progress in Myrtaceae Genetics and Genomics: *Eucalyptus* as the Pivotal Genus. Tree Genet Genomes. 2012;8(3):463–508.

Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. Infect Genet Evol. 2014;21:583–92. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.013.

Guala MS, Lapissonde MO, Elder HV, van Baren CM, Bandoni AL, Dellacassa E. Rose pepper (*Schinus molle* L.) oil.⁴ In: Preedy V, editor. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. San Diego: Academic Press, Elsevier Inc.; 2016. p. 689–95.

Guillot JF. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ann Rech Vet. 1989;20(1):3-16.

Guinan ME, Dan BB, Guidotti RJ, Pattison CP, Hargrett NT, Steece R. Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. Ann Intern Med. 1982;96(6 Pt 2):944–7.

Hackbarth CJ, Chambers HF, Francisco S. *blaI* and *blaR1* Regulate β -Lactamase and PBP 2a Production in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(5):1048-55.

Hacker J, Kaper JB. PATHOGENICITY ISLANDS AND THE EVOLUTION OF MICROBES. Annu Rev Microbiol. 2000;54:641-79.

Hadjab W, Zellagui A, Mokrani M, Yahia M, Righi FA. Propolis Biomolecules Attenuates Virulence Factors of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: In Vitro and In Silico Investigation.⁵ Sci Adv Mater. 2024;16(6):532-45. doi: 10.1166/sam.2024.4580.

Hakim Haj Moussa, Benamara S, Benhalima H, Benaliouche F, Sbartai I, Sbartai H. Chemical characterization of *Eucalyptus (Eucalyptus globulus)* leaf essential oil and evaluation of its antifungal, antibacterial and antioxidant activities. *Cell Mol Biol.* 2025;70(12):1–9. doi: 10.14715/cmb/2024.70.

Hamdan DI, Al-Gendy AA, El-Shazly AM. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oils of *Schinus molle* growing in Egypt. *J Pharm Sci Res.* 2016;8(8):779.

Hammadi KM, Yousif AA. Detection of slime material in *Staphylococcus aureus* bacteria from ovine mastitis by transmission electron microscope and Congo red agar method. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014;3(4):304-9.

Han Y, Chen W, Sun Z. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. *J Food Saf.* 2021;41(5):e12918.

Hanke ML, Kielian T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity.⁶ *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:62.

Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol.* 2006;17(3-4):111-24.

Hardel DK, Sahoo LS. A review on phytochemical and pharmacological of *Eucalyptus globulus*: a multipurpose tree. *Int J Res Ayurveda Pharm.* 2011;2(5):1527–30.

Harkat-Madouri L, Asma B, Madani K, Bey-Ould Si Said Z, Rigou P, Grenier D, et al. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Ind Crops Prod.* 2015;78:148–53.

Hasni S, Rigane G, Ghazghazi H, Riguene H, Bouallegue A, Khedher O, et al. Optimum Conditions and LC-ESI-MS Analysis of Phenolic Rich Extract from *Eucalyptus marginata* L. Under Maceration and Ultrasound-Assisted Extraction Methods Using Response Surface Methodology. *J Food Qual.* 2021;2021:5591022.

Hayat U, Idrees Jilani M, Rehman R, Nadeem F. A Review on *Eucalyptus globulus*: A New Perspective in Therapeutics. *IJCBS.* 2015;8(3):85–91.

Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures.⁷ *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(6):1219–25.

Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):815–36. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.

Herman-Bausier P, Labate C, Towell AM, Derclaye S, Geoghegan JA, Dufrêne YF. *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(21):5564–9. doi: 10.1073/pnas.1718104115.

Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Curr Drug Targets.* 2003;4(3):181–90. doi: 10.2174/1389450033346920.

Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Basset S, Athanasopoulos AN, Goutagny M, et al. Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation.⁸ *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:180. doi: 10.3389/fcimb.2016.00180.

Howden BP, Giulieri SG, Lung TWF, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(6):380–95. doi: 10.1038/s41579-023-00852-y.

Huaman Y, de la Cruz OA, Bosilcov A, Batiu I. Essential oil from the fruits of *Schinus molle* L. from Peru. *J Essent Oil Bear Plants.* 2004;7(3):223-7.

Huang S, Hon K, Bennett C, Hu H, Menberu M, Wormald PJ, et al. *Corynebacterium accolens* inhibits *Staphylococcus aureus* induced mucosal barrier disruption. *Front Microbiol.* 2022;13:984741.

Hussein HS, Tawfeek ME, Abdelgaleil SAM. Chemical composition, aphicidal and antiacetylcholinesterase activities of essential oils against *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). *J Asia Pac Entomol.* 2021;24(1):259–65.

Ilgün S, Şeker Karatoprak GÖ, Çiçek Polat D, Köngül Şafak E, Yücel Ç, İnce U, et al. Assessment of phenolic composition, antioxidant potential, antimicrobial properties, and antidiabetic activity in extracts obtained from *Schinus molle* L. leaves and fruits. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023;28(12).

Inagaki R, Koshiba A, Nasuno E, Kato N. Eliminating extracellular autoinducing peptide signals inhibits the *Staphylococcus aureus* quorum sensing agr system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;711:149912.

International Organization for Standardization. Crude or rectified oils of *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus globulus* Labill.). ISO 770:2002. Geneva: ISO; 2002.

Irving W, Boswell T, Ala'Aldeen D. *Mikrobiologia Medyczna. Krótkie Wykłady*. Warszawa (Poland) : Wydawnictwo Naukowe PWN ; 2008. p. 285–7.

Iseppi R, Mariani M, Condo C, Sabia C, Messi P. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(4):417.

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 2003;6(1):41–52. doi: 10.1016/S1368-7646(03)00003-7.

Jean-Luc Aboya Moroh. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morindamorindoides* [Thèse de doctorat]. Brest : Université de Bretagne occidentale - Brest ; 2013.

Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2009;4(5):565–82. doi: 10.2217/fmb.09.30.

Ji G, Beavis RC, Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12055–9.

Kadri A, Aouadi K. In vitro antimicrobial and α -glucosidase inhibitory potential of enantiopure cycloalkylglycine derivatives: Insights into their in silico pharmacokinetic, druglikeness, and medicinal chemistry properties. *J Appl Pharm Sci*. 2020;10(7):107–15.

Kassahun A, Feleke G. Chemical Composition and Physico-Chemical Analysis of Eucalyptus Globulus Leave and Oil. *Sci J Chem*. 2019;7(2):36-8. doi: 10.11648/j.sjc.20190702.11.

Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev*. 2005;105(2):425–48. doi: 10.1021/cr030103a.

Kaito C, Sekimizu K. Colony Spreading in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007;189(6):2553-7.

Kang HK, Park Y. Glycopeptide antibiotics: structure and mechanisms of action. *J Bacteriol Virol*. 2015;45(2):67–78. doi: 10.4167/jbv.2015.45.2.67.

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017;33(3):300-5.

Kasimala MB, Kasimala BB. A review on Brazilian pepper plant: *Schinus molle*. *J Atoms Mol*. 2012;2(2):6.

Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9:23.

kaur Sodhi K, Singh CK. Recent development in the sustainable remediation of antibiotics: a review. *Total Environ Res Themes*. 2022;3-4:100008. doi: 10.1016/j.totert.2022.100008.

Kavanaugh JS, Thoendel M, Horswill AR. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol*. 2007;65(3):780–98.

Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):634-44.

Kebriaei R, Lehman SM, Shah RM, Stamper KC, Kunz Coyne AJ, Holger D, et al. Optimization of phage-antibiotic combinations against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiol Spectr*. 2023;11(3):e04918-22.

Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, et al. Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PLoS One. 2012;7(6):e39495.

Khan MH, Dar NA, Alie BA, Hassan S, Hamid M, Ahmad S, et al. Unraveling the Variability of Essential Oil Composition in Different Accessions of *Bunium persicum* Collected from Different Temperate Micro-Climates. Molecules. 2023;28(5):2404.

Kim MJ, Kim DW, Kim JG, Shin Y, Jung SK, Kim YJ. Analysis of the Chemical, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Pink Pepper (*Schinus molle* L.). Antioxidants (Basel). 2021;10(7):1062. doi: 10.3390/antiox10071062.

Kläui AJ, Boss R, Graber HU. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island vSa: an In Silico Approach. J Bacteriol. 2019;201(19):e00345-19.

Kloss WE, Wolfshohl JF. Identification of *Staphylococcus* species with the API Staph ident. System. J Clin Microbiol. 1982;16(2):339-41.

Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNIII-*agr* regulatory region. J Bacteriol. 2004;186(22):7549–55.

Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(10):1486–513.

Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. Int J Bacteriol. 2013;2013:464523.

Kumar Yadav S. Physicochemical Properties of Essential Oils and Applications. IntechOpen; 2022. doi: 10.5772/intechopen.104112.

Laribi, A., & Zaouani, M. (2023). De l'antibiothérapie à l'antibiorésistance (Doctoral dissertation, Alger: École Nationale Supérieure Vétérinaire).

Ladhani S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. Clin Microbiol Infect. 2001;7(6):301–7. doi: 10.1046/j.1198-743X.2001.00258.x.

- Lakshmi SA, Bhaskar JP, Krishnan V, Sethupathy S, Pandipriya S, Aruni W, et al. Inhibition of biofilm and biofilm-associated virulence factor production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by docosanol. *J Biotechnol.* 2020;317:59–69.
- Lalia A, Harizia A, Righi K, Daikh ZE. Chemical composition and allelopathic potential of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) essential oils against common weeds of wheat crop. *Nat Prod Res.* 2025;39(4):682-8.
- Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol.* 2002;92 Suppl:46S–54S.
- Lan L, Cheng A, Dunman PM, Missiakas D, He C. Golden Pigment Production and Virulence Gene Expression Are Affected by Metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2010;192(12):3068-77.
- Laxminarayan R BZ, Duse A. Drug resistance. New York (NY): Oxford University Press; 2006.
- Le Minor L, Véron M. Bactériologie médicale. 2ème éd. Paris: Médecine-Sciences Flammarion; 1989.
- Lee JH, Kim YG, Lee K, Kim CJ, Park DJ, Ju Y, et al. Streptomyces-derived actinomycin D inhibits biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and its hemolytic activity. *Biofouling.* 2016;32(1):45-56.
- Lee KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol.* 2015;6:1174.
- Lennette EH. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Washington (DC): ASM Press; 1985.
- Lewis K, Ausubel FM. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1504–7. doi: 10.1038/nbt1206-1504.
- Liesse Iyamba JM, Seil M, Devleeschouwer M, Takaisi Kikuni NB, Dehaye JP. Study of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Biofouling.* 2011;27(8):811–21. doi: 10.1080/08927014.2011.604776.

Lin J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2015;6:34.

Lin MH, Ke WJ, Liu CC, Yang MW. Modulation of *Staphylococcus aureus* spreading by water. *Sci Rep.* 2016;6:25233.

Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus* The International Nomenclature Committee for Staphylo-coccal Superantigens proposes an international procedure for. *J Infect Dis.* 2004;189(12):2321-3. doi: 10.1086/420852.

Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martínez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(49):19484–9.

Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 2004;12(8):378–85. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.004.

Linz MS, Mattappallil A, Finkel D, Parker D. Clinical impact of *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(3):557.

Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Skaar EP, DeLeo FR, Salerno JJ, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 2005;202(2):209–15.

Liu H, Archer NK, Dillen CA, Dube PH, Bubeck Wardenburg J, Miller LS. *Staphylococcus aureus* Epicutaneous Exposure Drives Skin Inflammation via IL-36-Mediated T Cell Responses. *Cell Host Microbe.* 2017;22(5):653–66.e5.

Liu Y, Breukink E. The membrane steps of bacterial cell wall synthesis as antibiotic targets. *Antibiotics (Basel).* 2016;5(3):28. doi: 10.3390/antibiotics5030028.

López-Meneses AK, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Fernández-Quiroz D, Rodríguez-Félix F, Mouriño-Pérez RR, et al. *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT.* 2018;96:597-603.

Ložienė K, Švedienė J, Paškevičius A, Raudonienė V, Sytar O, Kosyan A. Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. *Fitoterapia*. 2018;127:20–4.

Lucock M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):121–38.

Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues L, Flores P, Falcão S, et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crops Prod*. 2015;77:101-10.

Luong TT, Ouyang S, Bush K, Lee CY. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J Bacteriol*. 2002;184(13):3623–9. doi: 10.1128/JB.184.13.3623-3629.2002.

Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO, Velázquez-Contreras CA, Acosta-Silva AL, Santacruz-Ortega HDC, Burgos-Hernández A, et al. Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *J Nanomater*. 2016;2016:6060137.

Machado CD, Raman V, Rehman JU, Maia BH, Meneghetti EK, Almeida VP, et al. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). *Rev Bras Farmacogn*. 2019;29(1):1-10.

Maema LP, Potgieter M, Mahlo SM. Invasive alien plant species used for the treatment of various diseases in Limpopo Province, South Africa. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016;13(3):223–31.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international

expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–81.

Mahdally NH, George RF, Kashef MT, Al-Ghobashy M, Murad FE, Attia AS. Staquorsin: A Novel *Staphylococcus aureus* Agr-Mediated Quorum Sensing Inhibitor Impairing Virulence *in vivo* Without Notable Resistance Development. *Front Microbiol.* 2021;12:700494. doi: 10.3389/fmicb.2021.700494.

Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Antimicrobial agent mechanisms of action and resistance. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology.* St. Louis: Saunders; 2014. p. 254–73.

Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(18):3057–71. doi: 10.1007/s00018-010-0389-4.

Malani M, Thodikayil AT, Saha S, Nirmal J. Carboxylated nanofibrillated cellulose empowers moxifloxacin to overcome *Staphylococcus aureus* biofilm in bacterial keratitis. *Carbohydr Polym.* 2024;324:121558.

Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol.* 2001;67(3):187-95.

Marongiu B, Porcedda APS, Casu R, Pierucci P. Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L. *Flavour Fragr J.* 2004;19(6):554–8.

Martínez-Millán M, Cevallos-Ferriz SRS. Arquitectura foliar de Anacardiaceae. *Rev Mex Biodiv.* 2005;76(2):137–90.

Martins MR, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(1):485-92.

Matilla MA, Krell T. The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1):1–19.

McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr Sci.* 2002;83(7):845-55.

McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):252–62.

Mehta J, Utkarsh K, Fuloria S, Singh T, Sekar M, Salaria D, et al. Antibacterial potential of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and its bioactive molecules against uropathogens—an *in silico* study to identify potential lead molecule(s) for the development of new drugs to treat urinary tract infections. *Molecules.* 2022;27(15):4971.

Mendes Silva S, Yae Abe S, Seigi Murakami F, Frensch G, Marques Francisco A, Nakashima T. Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. *Pharmaceuticals (Basel).* 2011;4(12):1535-50.

Merghni A, Belmamoun AR, Urcan AC, Bobis O, Lassoued MA. 1,8-Cineol (Eucalyptol) disrupts membrane integrity and induces oxidative stress in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(7):1388.

Merghni A, Noumi E, Hadded O, Dridi N, Panwar H, Ceylan O, et al. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog.* 2018;118:74–80.

Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(10):1221–36.

Miranda I, Lima L, Quilho T, Knapic S, Pereira H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties.¹ *Ind Crops Prod.* 2016;82:81–7.

Mishra NN, Liu GY, Yeaman MR, Nast CC, Proctor RA, McKinnell J, et al. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides.² *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):526–31. doi: 10.1128/AAC.00680-10.

Moreira P, Matos P, Figueirinha A, Salgueiro L, Batista MT, Branco PC, et al. Forest Biomass as a Promising Source of Bioactive Essential Oil and Phenolic Compounds for Alzheimer’s Disease Therapy.³ *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8812.

Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008;198(7):962–70.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Rumbaugh KP, O'Toole GA, editors. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens.* Hoboken (NJ): Wiley; 2016. p. 481–511.

Musk DJ, Banko DA, Hergenrother PJ. Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*.⁴ *Chem Biol.* 2005;12(7):789-96.

Nacouzi D, Masry R, El Kayal W. Quality and Phytochemical Composition of Sweet Cherry Cultivars Can Be Influenced by Altitude. *Plants (Basel).* 2023;12(12):2254.

Nagaraja V, Godbole AA, Henderson SR, Anthony M. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy.⁵ *Drug Discov Today.* 2017;22(3):510–8. doi: 10.1016/j.drudis.2016.11.006.

Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum Sensing and Phytochemicals. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12607-19.

Ng WL, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet.* 2009;43:197–222.

Nguyen PT, Nguyen TT, Bui DC, Hong PT, Hoang QK, Nguyen HT. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiol.* 2020;6(4):451-71.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593–656.

Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci.* 2008;49(1):21–31. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.007.

Niyazi D, Micheva I, Markovska R, Stoeva T. Phenotypic And Molecular Detection Of Slime Producing *Staphylococcus* Spp. Obtained From Blood Samples Of Patients Undergoing Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Acta Med Bulgarica*. 2022;49(2):29-37.

Noronha CM, De Carvalho SM, Lino RC, Barreto PLM. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chem*. 2014;159:529–35.

Noumi E, Snoussi M, Hadjlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains.⁶ *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(1):81–8. doi: 10.1007/s10096-009-0824-3.

Nourbakhsh F, Namvar AE. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control*. 2016;11(3):Doc07.

Novick R, Subedi A. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*.⁸ *Chem Immunol Allergy*. 2007;93:42-57.

Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, et al. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*.⁷ *Mol Gen Genet*. 1995;248(4):446–58.

Nunes MR, Da Rosa CG, De Borba JR, Dos Santos GM, Ferreira AL, Barreto PLM. Zein nanoparticles: Bioactive compounds and controlled delivery. In: Jana S, Jana S, editors. *Nanoengineering of Biomaterials*. Hoboken (NJ): Wiley; 2022. p. 411–36.

Nyakudya TT, Mahoa O, Samie A, Chivandi E, Erlwanger KH, Gundidza MB, et al. Physicochemical characterization of hexanic seed oil extract from the pepper tree (*Schinus molle*) of South African origin. *Afr J Biotechnol*. 2013;12(8):854-9.

O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis.⁹ *Mol Microbiol*. 1998;28(3):449–61.

Okolie NP, Falodun A, Davids O. Evaluation of the antioxidant activity of root extract of pepper fruit (*Dennetia tripetala*), and its potential for the inhibition of Lipid peroxidation. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014;11(3):221-7.

Oliveira A, Cunha MLRS. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2008;14(4):572-96.

Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):252.

Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):450–60. doi: 10.1093/jac/dki492.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. *Psidium guajava*. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4*. 2009.

Othman IM, Gad-Elkareem MA, Snoussi M, Aouadi K, Kadri A. Novel fused pyridine derivatives containing pyrimidine moiety as prospective tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: Design, synthesis, pharmacokinetics and molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1219:128651.

Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2014;17:32–7. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.

Padiyara P, Inoue H, Sprenger M. Global Governance Mechanisms to Address Antimicrobial Resistance. *Infect Dis Res Treat*. 2018;11:1178633718767887. doi: 10.1177/1178633718767887.

Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):VM-0022-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0022-2015.

Pannu MK, Hudman DA, Sargentini NJ, Singh VK. Role of SigB and staphyloxanthin in radiation survival of *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2019;76(1):70–7. doi: 10.1007/s00284-018-1586-x.

Pell SK, Mitchell JD, Miller AJ, Lobova TA. Anacardiaceae. In: Kubitzki K, editor. *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants, Eudicots-Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*. Berlin/Heidelberg (Germany): Springer; 2011. p. 7–50.

Pellegrini MC, Alvarez MV, Ponce AG, Cugnata NM, De Piano FG, Fuselli SR. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *J Essent Oil Res.* 2014;26(6):458-65.

Pelz A, Wieland KP, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Götz F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2005;280(37):32493-8.

Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1988;170(9):4365–72.

Peng Q, Tang XH, Dong WY, Sun N, Yuan WC. A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism. *Antibiotics (Basel).* 2022;12(1):12. doi: 10.3390/antibiotics12010012.

Periasamy S, Joo HSJ, Duong AC, Bach THL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(4):1281-6.

Perigo CV, Torres RB, Bernacci LC, Guimaraes EF, Haber LL, Facanali R, et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. *Ind Crops Prod.* 2016;94:528-39.

Pibiri MC. Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles [Thèse de Doctorat]. Lausanne: Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit ; 2005. p. 28-42.

Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *BioMed Res Int.* 2018;2018:4657396. doi: 10.1155/2018/4657396.

Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010;2(8):2177–97. doi: 10.3390/toxins2082177.

Plaza M, Ricalde M. Setting Physics-Chemical Quality Parameters from Essential Oil of *Schinus Molle* l. Obtained by Steam. *Rev Cienc Tecnol Innov.* 2015;11(12):693-6.

Podkowik M, Perault AI, Putzel G, Balestrino D, Lories E, Sifré E, et al. Quorum-sensing *agr* system of *Staphylococcus aureus* primes gene expression for production from lethal oxidative stress. *eLife*. 2023;12:89098.

Pollitt EJ, Diggle SP. Defining motility in the Staphylococci. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(16):2943–58.

POWO. *Eucalyptus globulus* L. Plants of the World Online [Internet]. 2025 [cited 2025 Nov 22]. Available from: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:592965-1>.

POWO. *Schinus molle* L. Plants of the World Online [Internet]. 2025 [cited 2025 Nov 22]. Available from: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:71044-1>.

Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(5):309–18. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(5):466-71. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.

Puca Pacheco M, Ascue Caballero MA, Neira Velázquez MG, Girao Sanchez AA, Pilco Pazos SE, Calla Chacon MK, et al. Extraction Of Essential Oil From *Eucalyptus* Leaves (*Eucalyptus Globulus*) By Steam Distillation And Its Physicochemical And Microbiological Characterization. *Rev Soc Quím Perú*. 2024;90(4):216-28.

Punitha T, Moorthy K, Vijayalakshmi P, Vinodhini R, Saranya S, Bhuvaneshwari M, et al. In vitro antibacterial activity of essential plant oils against biofilm forming methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Asian J Pharm Clin Res*. 2014;7 Suppl S1:220–5.

Raeber J, Steuer C. Exploring New Dimensions: Single and Multi-Block Analysis of Essential Oils Using DBDI-MS and FT-IR for Enhanced Authenticity Control. *Anal Chim Acta*. 2023;1277:341657.

Rajkumar HR, Devaki R, Kandi V. Evaluation of different phenotypic techniques for the detection of slime produced by bacteria isolated from clinical specimens. *Cureus*. 2016;8(2):e503.

Ramírez-Albores JE, Richardson DM, Stefenon VM, Bizama GA, Pérez-Suárez M, Badano EI. A global assessment of the potential distribution of naturalized and planted populations of the ornamental alien tree *Schinus molle*. *NeoBiota*. 2021;68:105–26. doi: 10.3897/neobiota.68.68572.

Ramos AS, Ribeiro JB, Teixeira BG, Ferreira JLP, Silva JRA, Ferreira AA, et al. Hydroxylation of 1,8-cineole by *Mucor ramannianus* and *Aspergillus niger*. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):261-4.

Rashed AA, Rahman AZA, Rathi DNG. Essential Oils as a Potential Neuroprotective Remedy for Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Review. *Molecules*. 2021;26(4):1107.

Ravindran PN. The encyclopedia of herbs & spices. Wallingford (UK): CAB International; 2017.

Razzak A, Khiari R, Moussaoui Y, Belgacem N. *Schinus Molle*: Currently Status and Opportunity. In: Khiari R, Jawaid M, Belgacem MN, editors. Annual Plant: Sources of Fibres, Nanocellulose and Cellulosic Derivatives. Singapore: Springer Nature Singapore; 2023. p. 535–51. doi: 10.1007/978-981-99-2473-8_18.

Rehman R, Hayat U, Jilani MI, Nadeem F. A review on *Eucalyptus globulus*: A new perspective in therapeutics. *Int J Curr Biomed Sci*. 2015;8(2):85–91.

Reiner K. Catalase Test Protocol. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2010.

Rekioua N, Boumendjel M, Taibi F, Samar MF, Jemaa JMB, Benaliouch F, et al. Insecticidal effect of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* essential oils on a stored food pest *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Cell Mol Biol*. 2022;68(4):144–57.

Rewatkar AR, Wadher BJ. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* - Biofilm formation methods. *IORS J Pharm Biol Sci*. 2013;8(5):36-40.

Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control *agr* expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2011;193(21):6020–31. doi: 10.1128/jb.05436-11.

Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482–501.

Reygaert WC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci.* 2009;22(2):115–9.

Rey-Valeirón C, Guzmán L, Saa LR, López-Vargas J, Valarezo E. Acaricidal activity of essential oils of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch and *Schinus molle* L. on unengorged larvae of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Essent Oil Res.* 2017;29(4):344–50.

Rhouma A, Ben Daoud H, Ghanmi S, Ben Salah H, Romdhane M, Demak M. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *J Plant Pathol.* 2009;91(2):339-45.

Rocha PMDM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, et al. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules.* 2012;17(10):12023-36.

Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38433–40. doi: 10.1074/jbc.M402122200.

Rossi YE, Palacios SM. Insecticidal toxicity of *Eucalyptus cinerea* essential oil and 1,8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. *Ind Crops Prod.* 2015;63:133-7.

Rossini C, Menéndez P, Dellacassa E, Moyna P. Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan origin. *J Essent Oil Res.* 1996;8(1):71–3.

Rosso A, Lollo G, Chevalier Y, Troung N, Bordes C, Bourgeois S, et al. Development and structural characterization of a novel nanoemulsion for oral drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2020;593:124614.

Rouessac F. *Analyse Chimique: méthodes et techniques instrumentales modernes.* Paris: Ed. Masson; 1992.

Rouibi A, Saidi F, Boutoumi H. Identification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and determination of antimicrobial effects of essential oils from peppertree (*Schinus molle* L.). *Acta Hort.* 2010;853:219-28. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.853.26.

Sabo AV, Knezevic P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Plant extracts and essential oils: a review. *Ind Crops Prod.* 2019;132:413–29.

Saedi S, Derakhshan S, Ghaderi E. Antibiotic resistance and typing of *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Sanandaj, Western Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(10):1307-14. doi: 10.22038/ijbms.2020.46064.10661.

Sagar PK, Sharma P, Singh R. Inhibition of quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation by *eucalyptus globulus* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pharmacopuncture.* 2022;25(1):37-43.

Salem N, Kefi S, Tabben O, Ayed A, Jallouli S, Feres N, et al. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence of synergism with antimicrobial standards. *Ind Crops Prod.* 2018;124:115–25.

Sandasi M, Leonard C, Viljoen M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(1):30–5.

Santos JA, Lamers MH. Novel Antibiotics Targeting Bacterial Replicative DNA Polymerases. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(11):776. doi: 10.3390/antibiotics9110776.

Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in Plain Sight: Interplay between *Staphylococcal* Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol.* 2014;5:37.

Schulz H, Ozkan G, Baranska M, Kruger H, Ozcan G. Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc.* 2005;39(2):249–56.

Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002744. doi: 10.1371/journal.ppat.1002744.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckeaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(5):519–42. doi: 10.1016/j.femsre.2004.04.001.

Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol.* 2017;28(1):82-e19. doi: 10.1111/vde.12362.

Scocchera E, Wright DL. The Antifolates. In: Fisher J, Mobashery S, Miller M, editors. *Antibacterials. Volume II.* Cham (Switzerland): Springer; 2017. p. 123–49.

Scott Champney W. The other target for ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation. *Infect Disord Drug Targets.* 2008;6(4):377–90. doi: 10.2174/187152606779025842.

Sébastien D. Examen cyto bactériologique d’urine. *Biotechnologie. E-monsite;* 2018.

Shah SN, Khan I, Tul Muntaha S, Hayat A, Ur Rehman M, Shah TA, et al. Bioactive, antioxidant and antimicrobial properties of chemically fingerprinted essential oils extracted from *Eucalyptus globulus*: *In-vitro* and *in-silico* investigations. *Front Chem.* 2023;11:1287317.

Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils: from plant chemocology to traditional healing systems. *Molecules.* 2017;22(1):70.

Sharma AD, Verma A, Gaur R, Sharma D, Sharma P. Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. *Drug Anal Res.* 2021;5(1):26-38.

Shehata ME, El-Sherbiny GM, Sharaf MH, Kalaba MH, Shaban AS. Phytochemical analysis, antimicrobial, antioxidant, and cytotoxicity activities of *Schinus molle* (L.) extracts. *Biomass Convers Biorefin.* 2025;15(3):3753-70. doi: 10.1007/s13399-024-05301-1.

Shiferaw Y, Kassahun A, Tedla A, Feleke G, Abebe AA. Investigation of essential oil composition variation with age of *Eucalyptus globulus* growing in Ethiopia. *Nat Prod Chem Res.* 2019;7(360):10-35248.

Siems W, Sommerburg O, Schild L, Augustin W, Langhans CD, Wiswedel I. β -Carotene cleavage products induce oxidative stress *in vitro* by impairing mitochondrial respiration. *FASEB J*. 2002;16(10):1289–91.

Simionatto E, Chagas MO, Peres MT, Hess SC, Silva CBD, Ré-Poppi N, et al. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *Schinus molle* (Anacardiaceae). *J Essent Oil Bear Plants*. 2011;14(5):590-9.

Socohou A, Sina H, Degbey C, Adjobimey T, Sossou E, Boya B, et al. Pathogenicity and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the hospital environment of CHU-Z Abomey-Calavi/Sô-Ava (Benin). *Biomed Res Int*. 2021;2021:6637617.

Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 2014;18:96-104.

Souto EB, Cano A, Martins-Gomes C, Coutinho TE, Zielińska A, Silva AM. Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. *Bioengineering*. 2022;9(5):158.

Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JEJ. Trends in antimicrobial drug development: Implications for the future. *Clin Infect Dis*. 2004;38(9):1279–86. doi: 10.1086/420937.

Stackpole DJ, Vaillancourt RE, Alves A, Rodrigues J, Potts BM. Genetic variation in the chemical components of *Eucalyptus globulus* wood. *G3 Genes Genom Genet*. 2011;1(2):151–9.

Sivaraj, C., Pavithra, D., Pavithra, M., Jacob, J. P., Poornimaa, M., Ranjani, R., ... & Pandian, A. (2025). Molecular Mechanism of Action, Resistance to Antibiotics and Modern Approaches: An Overview. *The Microbe*, 100502.

Syroegin EA, Flemmich L, Klepacki D, Vazquez-Laslop N, Micura R, Polikanov YS. Structural basis for the context-specific action of the classic peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Nat Struct Mol Biol*. 2022;29(2):152–61. doi: 10.1038/s41594-022-00720-y.

Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol.* 2013;58(1):47–52.

Tadjeddine N, Lassouani A, Keddari AB. Anti-microbial study of *Schinus molle* L. fruit essential oil western Algerian region. *Phytochim Subst Nat.* 2021;11(2):108-17.

Taruna Bhati KG, Nathiya P, Choudhary S, Kataria DAK. Detection of *icaA* and *icaD* genes for slime production in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk, udder surfaces and milkers' hands. In: *Molecular Epidemiology of Tetracycline and Quinolone Resistance Pattern and Studies*. Bhopal (India): ICAR-National Institute of Veterinary Epidemiology and Disease Informatics; 2018. p. 49-55.

Taylor L. *The healing power of rainforest herbs. A guide to understanding and using herbal medicinals*. New York (NY): Square One Publishers; 2005.

Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 2003;330(5):1005–14. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00662-4.

Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol.* 2011;186(11):6585-96.

Todirascu-Ciornea E, El-Nashar HA, Mostafa NM, Eldahshan OA, Boiangiu RS, Dumitru G, et al. *Schinus terebinthifolius* essential oil attenuates scopolamine-induced memory deficits via cholinergic modulation and antioxidant properties in a zebrafish model. *Evid Based Complement Altern Med.* 2019;2019:1–11.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603–61. doi: 10.1128/CMR.00134-14.

Tormo MÁ, Ferrer MD, Maiques E, Úbeda C, Selva L, Lasa Í, et al. *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol.* 2008;190(7):2434–40. doi: 10.1128/JB.01349-07.

Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, Basher NS, Idres T, Touati A. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(5):470. doi: 10.3390/antibiotics14050470.

Truchado P, Gil A, Tomas-Barberán FA, Allende A. Inhibition by chestnut honey of N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem*. 2009;57(23):11186–93.

Tsompanidou E, Denham EL, Becher D, de Jong A, Buist G, van Oosten M, et al. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(3):886–95.

Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(1):87.

Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chem*. 2011;126(1):228-35.

Uchiyama T, Araake M, Yan XJ, Miyanaga Y, Igarashi H. Involvement of HLA class II molecules in acquisition of staphylococcal enterotoxin A binding activity and accessory cell activity in activation of human T cells by related toxins in vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1992;87(2):322–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb02995.x.

Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health*. 2021;14(12):1750-66.

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wiczorek K, Dec M, Nowaczek A, et al. Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(8):1079.

Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira AP, Mendes Â, et al. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem Biodivers*. 2017;14(6):e1700006.

- Vinogradov E, Sadovskaya I, Li J, Jabbouri S. Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res.* 2006;341(6):738-43.
- Viszwapriya D, Subramenium GA, Prithika U, Balamurugan K, Pandian SK. Betulin inhibits virulence and biofilm of *Streptococcus pyogenes* by suppressing *ropB* core regulon, *sagA* and *dltA*. *Pathog Dis.* 2016;74(7):ftw088.
- Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med.* 2001;344(1):11–6.
- Vuong QV, Hirun S, Chuen TLK, Goldsmith CD, Munro B, Bowyer MC, et al. Physicochemical, Antioxidant and Anti-Cancer Activity of a *Eucalyptus robusta* (Sm.) Leaf Aqueous Extract. *Ind Crops Prod.* 2015;64:167–74.
- Wang B, Muir TW. Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles. *Cell Chem Biol.* 2016;23(2):214–24. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.01.004.
- Wang CY, Chen YW, Hou CY. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *Int J Food Prop.* 2019;22(1):230–8.
- Wang H, Fan Q, Wang Y, Yi L, Wang Y. Rethinking the control of *Streptococcus suis* infection: biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2024;290:110005.
- Wardenburg JB, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, DeLeo FR. Pantovaleutine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis.* 2008;198(8):1166–70.
- Webb PW, Nauen C, Lauder GV, Drucker EG. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. In: Breder CM, editor. *Fish. Bull.* Boca Raton (FL): CRC Press; 1998.
- Wieland B, Feil C, Gloria-Maercker E, Thumm G, Lechner M, Bravo JM, et al. Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1994;176(24):7719-26.

Williams RE. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* 1963;27:56–71.

Wise R. A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. *Can Respir J.* 1999;6 Suppl A:20A–2A.

World Health Organization Model List of Essential Medicines. 20th ed. Geneva (Switzerland): WHO; 2017.

Wu F, Bethke JH, Wang M, You L. Quantitative and synthetic biology approaches to combat bacterial pathogens. *Curr Opin Biomed Eng.* 2017;4:116-26.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009;37(1):1–17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

Wu X, Wang H, Xiong J, Yang GX, Hu JF, Zhu Q, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics. *Biofilm.* 2024;7:110080.

Yamazaki Y, Ito T, Tamai M, Nakagawa S, Nakamura Y. The role of *Staphylococcus aureus* quorum sensing in cutaneous and systemic infections. *Inflamm Regen.* 2024;44(1):9.

Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* 2002;277(15):13138–47.

Yeboah-Manu D, Kpeli GS, Ruf MT, Ofori-Amanfo G, Sarfo FS, Adjapong E, et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2191.

Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(5):1060–75.

Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: Paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:563–81.

Yueqin Z, Recio MC, Mânez S, Giner RM, Cerdâ-Nicohs M, Rios J. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta Med.* 2003;69(10):886–9.

Zadik PM, Davies S, Whittaker S, Mason C. Evaluation of a new selective medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 2001;50(5):476-9.

Zaki AA. Assessment of Anti-Quorum Sensing Activity for Some Ornamental and Medicinal Plants Native to Egypt. *Sci Pharm.* 2013;81(1):251–8.

Zellagui DR, Chemsâ A el K, Hadjab W. Chemical composition, antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities, *in vitro* and *in silico*, of the essential oil of Algerian endemic species *Daucus biseriatus* Murb. *Int J Environ Health Res.* 2024;1-15. doi: 10.1080/09603123.2024.2384910.

Zerrouk M. Mise en valeur des huiles essentielles des plantes aromatiques Algériennes (*Schinus molle*) [Thèse de doctorat]. Ouargla (Algérie): Université Kasdi Merbah; 2019.

Zheng Y, Cantley LC. Toward a Better Understanding of Folate Metabolism in Health and Disease. *J Exp Med.* 2018;215(3):725-33.

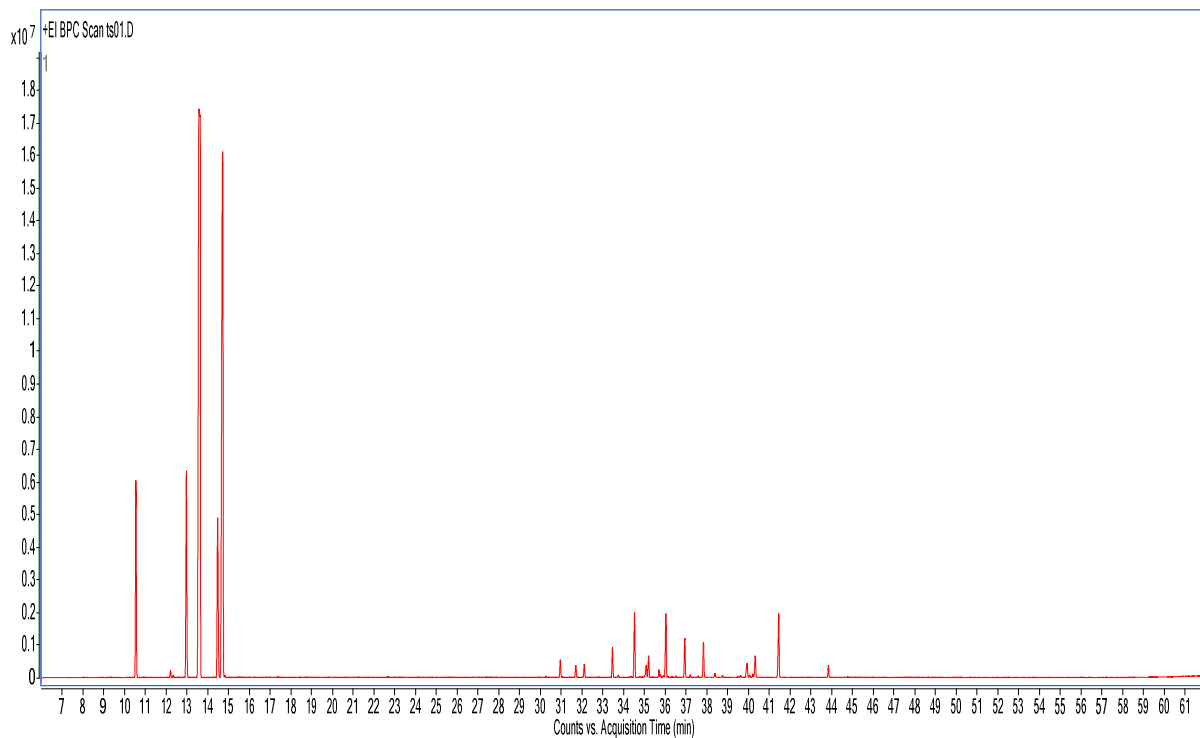
Zhu W, Clark NC, McDougal LK, Hageman J, McDonald LC, Patel JB. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):452–7.

Zhu Y. *Staphylococcus aureus* virulence factors synthesis is controlled by central metabolism [Dissertation]. Lincoln (NE): University of Nebraska; 2010.

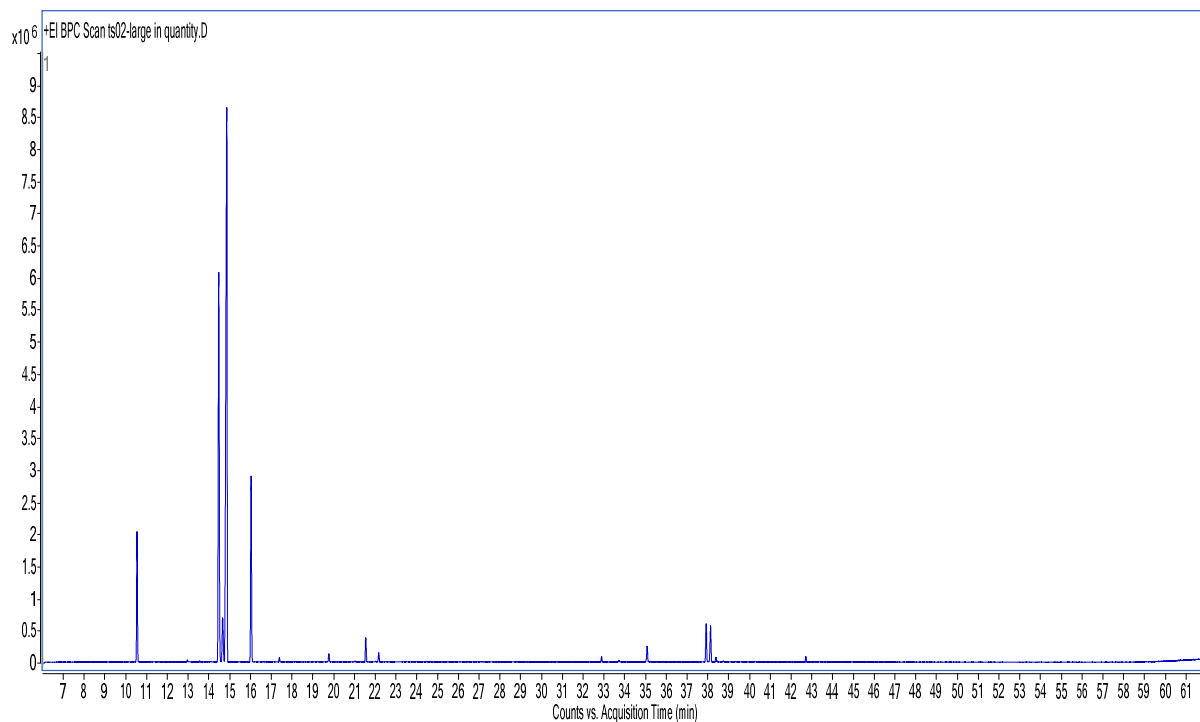
Zmantar T, Kouidhi T, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol.* 2010;33(2):137–45.

Zonfrillo M, Andreola F, Krasnowska EK, Sferrazza G, Pierimarchi P, Serafino A. Essential oil from *Eucalyptus globulus* (labill.) activates complement receptor-mediated phagocytosis and stimulates podosome formation in human monocyte-derived macrophages. *Molecules.* 2022;27(11):3488.

Annexe



Profil chromatographique pour l'huile de *S.molle*



Profil chromatographique pour l'huile d' *E.globulus*.

Publication

ORIGINAL ARTICLE

Antibacterial and QS Inhibition by *Schinus molle* Essential Oil: Chemical Profiling and Docking Against *S. aureus*

Soumia Tabti ¹, Djamila Boukraâ ¹, Widad Hadjab ², Oussama K. Belhadj ³, Yahia Khelef ⁴, Pilar Truchado ⁵, Isabel Martínez-Alcalá ⁶, Ramazan Erenler ⁷, Rokayya Sami ⁸, Amal Alyamani ⁹, Fayez Alsulaimani ^{10, 11}, Ahmed M. Basri ^{10, 11}, Roqayah H. Kadi ¹², Afnan M. Alnajeebi ¹²

¹ Geo-Environment and Space Development Laboratory (LGEDE), Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

² Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Department of Nature Science and Life, Faculty of Exact Science and Life Science and Nature, Larbi Ben M'hidi University, Oum El Bouaghi, Oum El Bouaghi, Algeria

³ Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety Laboratory (LBGMSS), Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

⁴ Biology Department, Faculty of Natural Science and Life, El Oued University, Algeria

⁵ Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo, Murcia, Spain

⁶ Social Responsibility, Sustainability and Innovation (GAIA) Research Group, Universidad Católica de Murcia, Murcia, Spain

⁷ Research Laboratory Practice and Research Center, Iğdir University, Iğdir, Türkiye

⁸ Department of Food Science and Nutrition, College of Sciences, Taif University, Taif, Saudi Arabia

⁹ Department of Biotechnology, College Sciences, Taif University, Taif, Saudi Arabia

¹⁰ Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Applied Medical Sciences, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

¹¹ Embryonic Stem Cell Unit, King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

¹² Department of Biological Sciences, College of Science, University of Jeddah, Jeddah, Saudi Arabia

SUMMARY

Background: Owing to the worldwide issues of resistance to antibiotics and the role of quorum sensing in the regulation and development of bacteria (*Staphylococcus aureus*) virulence factors, scientific communities explore alternatives to drugs, such as medicinal plants' essential oils. This study was performed to evaluate the anti-virulence, biofilm retardation, and quorum sensing (QS) retarding activities of *Schinus molle* essential oil (SMEO) against the pathogenic *S. aureus* and its Agr mutant strains and evaluate the anti-quorum activity of *S. molle* EO compounds.

Methods: The chemical composition of SMEO was measured using the Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) approaches. Antimicrobial activity was studied using agar disc diffusion.

Results: Notably, the results revealed 20 compounds with limonene (35.82%) and α -phellandrene (19.13%) dominant constituents. The antibacterial effects were assessed via the agar dilution method, while anti-QS activity was examined using *Chromobacterium violaceum* CECT 494. Remarkably, the SMEO exhibited strong bactericidal potentials, effectively destroying the bacterial cells within 24 hours duration with inhibition zones reaching up to (34.33 \pm 0.1 mm). Additionally, the SMEO inhibited staphyloxanthin formation, exopolysaccharide (EPS), and biofilm formation with significant reduction up to 96.27%, 93.78%, and 92.87%, respectively. Likewise, slime production and motility were highly affected by SMEO. These were done with extraordinary declines witnessed in a concentration-dependent pattern. Furthermore, the molecular docking analysis affirmed strong collaborations between the SMEO constituents and the AgrA and thereby supporting its antivirulence capability.

Conclusions: Findings obtained from this study highlighted the promising prospects of SMEO as a potent natural compound in mitigating *S. aureus* virulence and biofilm formations, indicating its potential use as an alternative treatment to antibiotics.

(Clin. Lab. 2025;71:1574-1590. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2025.250461)

Correspondence:

Rokayya Sami
 Department of Food Science and Nutrition
 College of Sciences
 Taif University
 P.O. Box 11099
 Taif
 Saudi Arabia
 Email: rokayya.d@tu.edu.sa

KEYWORDS

anti-quorum sensing, bioactive compounds, essential oil, inhibitory effects, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus, which is a notable Gram-positive microorganism, is among the prevailing pathogenic bacteria, both in indoor and outdoor environments, including medical facilities. This bacterium is highly resistant to harsh environmental conditions and numerous antibiotics, facilitating its ability to cause a wide range of infectious diseases, resulting in elevated morbidity and mortality rates [1]. Most illnesses triggered by *S. aureus* are principally difficult to cure, which may be associated with their capability to develop biofilms and other protective mechanisms. These enable it to evade the host's body immune systems and drug actions. Global drug abuse and self-medication have accelerated the evolution of multi-drug resistant *S. aureus*, which has rendered most conventional treatments less potent. This has created a situation supporting research into alternative therapeutic approaches [2]. Basically, these alternative medications raise the costs associated with handling these diseases, underscoring the need to find novel antimicrobial agents, including those acquired from natural sources [3].

Schinus molle (Peruvian pepper tree) is a remarkable plant with renowned pharmaceutical values, and it has been immensely exploited in traditional medicines. Essential oil (EO) produced from its leaves has shown substantial capability in broad-spectrum biological actions, including antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory actions [4]. The antiseptic potential of this EO has placed it as an excellent bio-agent that can replace synthesized antimicrobial drugs. This can be linked to its high proportions of terpenes and other phytochemical compounds, which retard growth and functionality of pathogenic microorganisms, addressing the challenges associated with multidrug-resistant bacterial strains [4].

Quorum sensing (QS), is a bacterial communication scheme, that has the potential of regulating numerous cellular actions, including biofilm production, development of virulence factor, and resistance workability [5]. The QS route relies heavily on the production, discharge, and recognition of autoinducers, enabling the

bacteria to synchronize their actions based on their population density [6]. Remarkably in *Staphylococcus aureus*, the QS plays an essential part in curbing infections and dodging the host immune responses [7]. Interestingly, targeting the QS structures will create a favorable medical approach, through alteration of the microbial pathogenicity, without causing a situation that will enforce selective pressure, which will drive the resistance. Notably, the hazards linked to QS, predominantly its ignorable part in facilitating biofilm toughness and antibiotic tolerance, have highlighted the necessity for adequate understanding of how EOs can obstruct these communication routes [8].

Though some basic attributes of *S. molle* EO have been observed and reported [7], there are no comprehensive scientific investigations into the specific relationship with bacterial quorum-sensing mechanisms, especially in a framework using the Agr quorum-sensing system of *Staphylococcus strains* bacteria. Furthermore, there is limited research on the comparative effectiveness of *S. molle* EO on wild type versus Agr mutant strains, creating a significant gap in properly understanding its full therapeutic prospects. This supervisory scheme that oversees vital virulence factors and biofilm formation is crucial to *Staphylococcus* species pathogenicity, including the prominent antibiotic-resistant strains [9]. Investigating the interplay between *S. molle* EO and quorum-sensing systems, along with its synergistic effects, could yield novel insights into its use as a bio-therapeutic agent, in the curative treatment of biofilm-associated and multidrug-resistant (MRD) bacterial infections.

MATERIALS AND METHODS**Materials**

The vegetative parts (leaves) of *Schinus molle* plant were obtained from Mascara, in the northwestern region of Algeria. The botanical identification was conducted by Dr. Boukraâ. The specimens (leaves) were kept in disinfected bags and transferred immediately to the biological laboratory. In the research laboratory, these samples were air-dried under in the dark using ambient temperature. Afterwards, the dried leaves were ground and the fine powder was kept in suitable environmental conditions.

Essential oil extraction

The extraction procedure of the sample's essential oil (EO), was carried out by utilizing the Clevenger apparatus. About 200 g of the plant powder was introduced into 300 mL of distilled water in the device, under atmospheric pressure for 3 hours [10]. The EO formed was then preserved at 4°C in brown glass vials. The yield of the EO was computed by using the formula displayed in Equation 1.

$$\text{Yield } \left(\% \frac{w}{w} \right) = \left(\frac{\text{Weight of Essential Oil Extracted}}{\text{Weight of Plant Material Used}} \right) 100 \dots \dots \dots (1)$$

Fourier transforms infrared (FT-IR) spectroscopy profiling

FTIR spectral was used to analyze the structural properties of SMEO. FTIR spectra were obtained using Shimadzu FTIR 4700 spectrometer instruments. Notably, the spectra in the absorbance mode were measured at a range of 4,000/cm to 400/cm. Trace amount the EO sample was basically positioned on the diamond ATR crystal surface and the spectrum documented [11].

Gas chromatography-mass spectrometry profiling of SMEO

The specimens' GC-MS examination was conducted using the Agilent Technologies GC7890A, fortified with a 5975 triple axis mass spectrometer, and HP-5 ms capillary column having these dimensions: 30 m × 250 μm × 0.25 μm. Ionization voltage was pre-set at 70 eV, and carrier gas (helium) flowed at the speed 1 mL/minute. Remarkably, the operating temperature was constant (100°C) for 10 minutes, before adjusting it to 200°C in the pattern of 5°C per minute, which was then maintained for 20 minutes. Then, the system temperature was increased by 5°C per minute up to 270°C. The compound constituents of the EO were identified through comparison with the NIST library, with mass spectra detailed in the m/z 50 - 550 scanning range [12].

Bacterial strain identification

The clinical isolate of *S. aureus* was obtained from patients' semen, pus, and urine samples, and identified in the laboratories of the Meslem-Taib Hospital, Mascara, Algeria (Table 1). Identification was confirmed through macroscopic observation on Chapman medium, microscopic examination using Gram staining, and biochemical assays, including catalase, oxidase and coagulase tests, performed according to Erenler R et al. [13]. *S. aureus* strains were acquired from King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, while *Chromobacterium violaceum* (CECT 494) strains were acquired from the University of Murcia, Spain (Table 2). Both strains were cultured in appropriate medium using the Luria Bertani (LB) broth, with incubation temperature of 37°C for 24 hours.

Disc diffusion method

The susceptibility of *S. aureus* strains to SMEO, was determined by employing the plate diffusion technique, with Mueller-Hinton Agar "MHA" [14]. *S. aureus* cultures were pre-cultured in Luria-Bertani (LB) broth, to boost the bacterium survival. These discs were subjected to incubation (37°C, 18 hours duration with constant vibration). Then a suspension of 1 × 10⁸ cfu/mL was inoculated on the MHA plates. The following antibiotic discs; Chloramphenicol (30 μg), Ciprofloxacin (5 μg), Gentamicin (10 μg), Penicillin G (10 μg), Tetracycline (30 μg), Cotrimoxazole (25μg), Amoxicillin (30μg), Oxacillin (1 μg), Amikacin (30 μg), Norfloxacin (10 μg), Cefazolin (30 μg), Rifampin (5 μg), and Pristinamycin (15 μg) were spread onto the plated agar sur-

face and incubated (37°C, 1 day). Finally, after this incubating procedure, the inhibition zone developed around each individual disc was measured, and its result was documented in millimeters (mm).

Antibacterial effect of *S. molle* essential oil

The SMEO antibacterial properties were assessed by utilizing the disc diffusion approach [15]. The prepared suspension was diluted to 10⁸ cfu/mL at 620 nm, and 100 μL of the bacterial dilution was coated evenly on top of the MHA plate. The sterile disc material soaked with EO at varying concentrations - 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, and 0.200 g/mL. Furthermore, the EO was suspended in 10% DMSO. These plates were subsequently placed in an incubator (37°C, 24 hours), and the inhibition sectors were read with a digital venire caliper.

Quorum sensing inhibition assay

C. violaceum (CECT 494) was obtained from the Campus de Espinardo, University of Murcia, Spain. Approximately 100 μL of cultured *C. violaceum* was uniformly spread across the LB agar plates, utilizing a sterilized swab. Then the sterilized mesh paper discs impregnated with different concentrations of SMEO (12.5, 25, 50, 100, and 200 mg/mL), were placed on the plates and incubated (30°C, 20 hours). The anti-quorum sensing action was calculated. The uncolored halo surrounding the disc indicated the absence of purple violacein production [16].

Quantification of violacein

The violacein quantification approach was carried out in harmony with the guidelines explained by Truchado et al. [16]. In this study's assay, 10 μL of *C. violaceum* cultured from 6 pm to 6 am was diluted with 2 mL of LB broth. This setup (culture) underwent incubation (30°C for 18 hours), using various SEMO's concentrations range of 12.5, 25, 50, 100, or 200 g/L, respectively, to evaluate the EO's influence on bacterial reproduction. Thereafter, these cultures were centrifuged (6,000 × g) for 10 minutes to achieve cell pellets, which were resuspended in 500 μL DMSO, vortexed thoroughly, and subsequently centrifuged (10,000 × g) for another 15 minutes. The violacein pigment which was dissolved in the frothy, was measured through by pipetting 0.2 mL of the suspension fluid to the 96-well plate. Finally, the readings were taken utilizing 585 nm absorbance level, and the violacein interference level (inhibition assay) was calculated using Equation 2.

$$\% \text{ Violacein inhibition} = \left(\frac{\text{Assay control OD at 585 nm}}{\text{Unknown sample OD at 585 nm}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

Effect of SMEO on virulence factors

Staphyloxanthin production assay

Staphyloxanthin is produced by certain *S. aureus* strains. The impact of SMEO on staphyloxanthin synthesis was evaluated using the ethanol extraction tech-

nique, following established methodologies [17]. In this procedure, 20 μL of a 24-hour culture of *S. aureus* was pipetted into LB broth (2 mL), containing EO at these concentrations - 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg/mL, and to the control unit. The set-ups were subjected to incubation (37°C, vibrations at 250 revolution per minute for 24 hours), and then centrifuged at $8,000 \times g$ for 10 minutes, to obtain cell pellets. These were subsequently washed thoroughly with sterilized phosphate-buffered saline (PBS), and the pellets were dispersed in 2 mL of ethanol. Then, the set-ups were transferred to the incubation chamber (40°C) for 20 minutes. Consequently, these incubated suspensions were subjected to centrifugation ($8,000 \times g$, 10 minutes), and the resulting supernatant was quantified at 465 nm. Inhibition rate of the staphyloxanthin production was computed using Equation 3.

$$\left(\frac{\text{Control OD}_{465 \text{ nm}} - \text{Treated OD}_{465 \text{ nm}}}{\text{Control OD}_{465 \text{ nm}}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

Slime production assay

The Congo red agar (CRA) approach was employed in evaluating the SMEO slime creation inhibition ability, following the guidelines outlined by Lee et al. [18]. In this method, the assay was performed in six-well microplates, and the agar was created by dissolving brain-heart infusion medium, sucrose, agar, and Congo red dye at concentrations of 37, 36, 15 and 0.8 g/L. The strains were inoculated onto the CRA plates, which were supplemented either with or deprived of the essential oil. The plates inoculated with strains without essential oil served as negative controls. All plates were subjected to incubation for 2 days, using a consistent temperature of 37°C. A positive outcome was designated by the presence of black colonies, having dry crystalline texture [19].

EPS inhibition assay

The EPS inhibition assay investigation was conducted by adopting the technique described by Viszwapriya et al. [20]. Briefly, 10 μL of overnight *S. aureus* cultures were inoculated into 24-well plates containing sterile glass slides (5/5). The cultures were incubated with or without SMEO at concentrations of 0, 12.5, 25, 50, 100, or 200 g/L at 30°C for a period of 18 hours; thereafter, the glass plates were cleaned utilizing antiseptic water, before resuspending them in 500 μL of 0.9% saline. Subsequently, 500 μL of 5% phenol was integrated into the suspension, following the addition of 2,500 μL of concentrated tetraoxosulphate (VI) acid. The culture was incubated in the dark for 60 minutes, and the subsequent absorbance level was evaluated at 490 nm. The EPS inhibition rate was then computed using Equation 4.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Where, A_0 ~ control absorbance, A_1 ~ absorbance of treated specimens.

Antibiofilm assays

Biofilm formation assay was performed by using 1 μL of strains overnight culture which was inoculated in 96 well micro-titer plate of polystyrene material containing 100 μL of LB broth, augmented with different concentrations of SMEO (0.25, 25, 50, 100, and 200 mg/mL) [21]. Control wells contained bacteria-free medium only. These plates were incubated at 38°C for 24 hours. Then, the cultures were detached from the wells and washed thoroughly using sterile PBS to eliminate the non-adhesive planktonic bacteria. Then, 100 μL of a 0.4% crystal violet (CV) solution was added to the individual wells, stained for 30 minutes, and rinsed five times using distilled water to eliminate the dye. Then, ethanol (200 μL) was introduced to each well, to solubilize the CV in the stained cells, and finally, the setup's optical density was determined with a spectrophotometer at 590 nm using Equation 5.

$$\frac{\text{OD Negative control} - \text{OD samples}}{\text{OD Negative control}} \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

Motility assay

The SMEO capability of inhibitory effect of *S. aureus*, was examined using the method described by Kearns [22]. Modified spreading plates were prepared by dissolving these compounds: Tryptone Soy Broth (TSB) (15 g) and Bacto agar (1.7 g) in distilled water (460 mL). This was autoclaved and cooled to room temperature (31°C). Glucose solution produced separately by dissolving D-glucose (4.5 g) in 40 mL H_2O was then mixed with the cooled medium and mixed thoroughly. Motility plates were prepared with and without SMEO at different concentrations (12.5, 25, 50, 100, and 200 mg/mL) and air-dried for 30 minutes in a secured cupboard, with the lids placed beside the dishes. After one day incubating (37°C) of the experimental units, the distances of the spreading motility zones were identified and documented. The inhibitory effect (spreading motility) of the SMEO was evaluated by comparing the diameters of these regions with those of the control.

Molecular docking analysis

Molecular docking analysis was done to appraise the anti-quorum activity of *S. molle* EO against the pathogenic bacterium *S. aureus*. The pdb file of the AgrA operon was chosen as the target due to its critical part in *S. aureus* pathogenesis. The AgrA pdb file (PDB code: 4G4K, resolution 1.52 Å) was obtained from Protein Data Bank (www.rcsb.org), while all ligand files were retrieved online (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). The AgrA operon pdb file was transformed to pdbqt version using AutoDock Virtual Screening Tools. All ligand and water molecules were detached except those within the active pocket of the receptor. Hydrogen atoms were incorporated before defining the vigorous

site of the receptor. In addition, the protonation state of the active site residues and the side chain orientations were adjusted, followed by energy minimization to optimize the structure. Ligand pdb files were also transformed to pdbqt format. The docking tests were performed with flexible ligand binding and rigid receptors using Auto Dock Vina [23]. The docking results were evaluated to determine the best binding positions, interaction energies, and key interactions with the AgrA active sites. The best positions were selected from the point of view of binding and their interactions with the enzymes. Through visualization using Discovery Studio software it was possible to understand the mechanism of binding and to search for potential lead compounds [23].

Statistics analysis

Statistical analysis of results obtained from the laboratory analyses was conducted by employing SPSS 27.0 software. The experiments were conducted in triplicate. Statistical mean differences between groups were analyzed by Tukey's post hoc test at a significance level of 0.01. Also, the two-way ANOVA was used to evaluate the influence of the SMEO on the bacteria.

RESULTS

Yield extract and chemical composition of SMEO

The yield of EO obtained from *S. molle* was 0.71 ± 0.01% (v/dry weight), with pale yellow color and a distinctly spicy, peppery aroma. The FTIR analysis of SMEO reveals several key functional groups typical of essential oil constituents (Figure 1).

A broad peak in the 3,300 - 3,500/cm range indicates O - H stretching vibrations, characteristic of hydroxyl groups (alcohols and phenols such as linalool and eugenol). Peaks at 2,900/cm match to C - H stretching vibrations, associated with terpens such as α -pinen and β -pinen. A peak approximately 1,700/cm depicts carbonyl groups, probably ketons or aldehyds (carvone, citral). The 1,500 - 1,600/cm region shows C = C stretching vibrations typical of aromatic compounds such as limonen. Finally, the 1,000 - 1,500/cm regions reveal C - O and C - H vibrations associated with terpenoids, including cineole and terpineol (Table 3).

The GC-MS analysis of SMEO depicted the presence of different chemical compounds, with a total of 20 molecules identified. Among these, monoterpene hydrocarbons were the predominant group with 80.07%, followed by sesquiterpene hydrocarbons with 15.12% and terpenoids with 2.78% (Table 3). The SMEO was particularly characterized by the high presence of limonene (35.82%) as the major component, followed by α -phellandrene (19.13%). Other notable components included o-cymene (7.93%), α -pinene (7.88%), tau-cadinol acetate (3.04%), γ -muurolene (3.00%), δ -cadinene (3.00%), elemol (1.71%), β -copaene (1.59%), humulene (1.32%), guaiol acetate (1.07%), α -muurolene (0.97%), α -ylan-

gene (0.86%), β -elemene (0.77%), β -cyclogermacrane (0.67%), caryophyllene (0.61%), α -gurjunene (0.53%), γ -cadinene (0.29%), and sabinene (0.27%) (Table 3).

Antibacterial activity

Following incubation, colonies exhibiting distinctive morphological characteristics of *S. aureus*, such as golden-yellow pigmentation on Chapman medium plates, were selected. The identification of *S. aureus* was established through a series of biochemical tests such as oxidase negativity and the positive results for catalase and coagulase activities.

Susceptibility testing

Findings of this strain's in-vitro susceptibility testing compared to the several antibiotics testing are mentioned in Table 5. The results indicated that all clinical strains isolated were resistant to most of the antibiotics studied. The antibiotics used led to classify these microbial isolates as the following: pathogenic and MRD strains [24].

Disc diffusion assays of SMEO

Figure 2 displayed the outcomes of the SMEO's antibacterial behavior, primarily against *S. aureus* clinical strains, including the mutant strains. The outcomes from the *in vitro* antimicrobial assay depicted that the EO demonstrated significant antibacterial activity (Figure 4). Dimethylsulfoxide (DMSO 10%) served basically as a negative control, displaying no antibacterial activity against the *S. aureus*. The EO of *S. molle* (SMEO) presented notable antimicrobial activity against all tested strains ($p < 0.01$). The most susceptible strains, S03 and AgrB, showed inhibition zones of 34.33 ± 0.1 mm and 33.06 ± 0.1 mm, respectively, when treated with 200 mg/mL of SMEO.

Quorum sensing inhibition assay

Disk diffusion method

The anti-quorum sensing (QS) activity of SMEO was evaluated using disk diffusion assays against *C. violaceum* (CECT 494). The QS inhibition zones produced by the SMEO were larger than the corresponding antibacterial zones, indicating a significant QS inhibitory effect (Figure 3a). The diameters of the QS inhibition halos were notably greater than those of the antibacterial halos, measuring 30.03 ± 0.15 mm and 15.1 ± 0.1 mm, respectively, at a concentration of 200 mg/mL. This suggests that SMEO exhibits a stronger affinity for QS inhibition than for antibacterial activity.

Quantification of violacein

The SMEO reduced violacein production significantly ~ $87.73 \pm 0.69\%$ ($p < 0.01$) at a concentration of 200 mg/mL, as shown in Figure 3b. In contrast, no significant reduction of violacein production was observed at 12.5 mg/mL.

Table 1. *Staphylococcus aureus* strains origin isolated.

Strains	S01	S02	S03	S04	S05	S06
Origin	semen	semen	urine	urine	urine	Pus

Table 2. Description of bacteria strains.

Strain name	Abbreviation	Description
NE1532	AgrA	alteration was imitative from <i>S. aureus</i> resistance to erythromycin
NE95	AgrB	mutant was derived from <i>S. aureus</i> resistant to erythromycin
NE873	AgrC	<i>S. aureus</i> mutant that encodes for accessory gene regulator protein C also it is resistant against erythromycin
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>	wild type
<i>Methicillin - resistance Staphylococcus aureus</i>	MRSA	methicillin resistance <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CECT 494	violacein production

Table 3. Functional group analysis of SMEO based on FTIR spectrum.

Wave number (cm ⁻¹)	Functional group	Peak intensity	Vibration mode	Correspondence
3,300 - 3,500	O - H	broad	stretching	alcohols (e.g., linalool), phenols (e.g., eugenol)
2,900	C - H	sharp	stretching	aliphatic chains (e.g., α -pinen, β -pinen)
1,700	C = O	sharp	stretching	carbonyl compounds (e.g., carvone, citral)
1,500 - 1,600	C = C	moderate	stretching	aromatic or alkenes (e.g., limonen, myrcen)
1,000 - 1,500	C - O, C - H	multiple peaks	stretching, bending	terpenoids (e.g., cineol, terpineol)

Effect of SMEO on virulence factors Staphyloxanthin inhibition assay

Figure 4 illustrates the impact of SMEO on Staphyloxanthin synthesis. This spectrometric quantification assay evaluated a situation where SMEO was either present or absent, using the various concentrations in *S. aureus* and its mutant strains. The results demonstrated that SMEO significantly inhibits staphyloxanthin production by 96.27 ± 0.24 ($p < 0.01$), with the highest concentration (200 mg/mL) yielding the most significant reduction across most strains.

Impact of SMEO on slime development

The results of the influence of SMEO on slime formation, in wild-type *S. aureus* and mutant strains are presented in Table 6. The findings depicted an inhibition of slime production in the tested strains. Slime production has a direct correlation to the strength of the black coloration surrounding the colonies. The absence of black coloration at 200 mg/mL suggests that slime production

was effectively inhibited. In contrast, the control, which showed no black coloration, indicated the absence of an inhibitory effect [18]. This observation conclusively supports that SMEO strongly inhibits slime production in the strains tested.

Quantification of EPS

Figure 5a. presents the results of the EPS production. The quantification analysis of EPS production, in the presence of SMEO at varying concentrations, revealed a substantial decline in EPS production in the Agr mutant strains, in comparison to the wild-type strains. These results underscore the influence of SMEO on EPS production. Precisely, SMEO inhibited EPS formation at a concentration of 200 g/L by $93.78 \pm 0.03\%$, $92.17 \pm 0.10\%$, and $91.92 \pm 0.06\%$ in AgrA, AgrC, and AgrB, respectively.

Table 4. Chemical composition of SMEO.

Peak	aRT (min)	bRI (nist)	cRI (exp)	d (%)	Name	
1	10.55	937	932	7.88	α -pinene	monoterpenes
2	12.21	974	972	0.27	sabinene	
3	12.97	991	988	9.07	β -myrcene	
4	13.58	1,005	999	19.13	α -phellandrene	
5	14.48	1,022	1,022	7.93	<i>o</i> -cymene	
6	14.72	1,030	1,028	35.82	limonene	
7	30.95	1,391	1,389	0.77	β -elemene	sesquiterpenes
8	31.70	1,409	1,407	0.53	α -gurjunene	
9	32.10	1,419	1,418	0.61	caryophyllene	
10	33.46	1,454	1,453	1.32	humulene	
11	34.52	1,477	1,480	3.00	γ -muurolene	
12	35.08	1,495	1,494	0.67	β -cyclogermacrane	
13	35.20	1,499	1,497	0.97	α -muurolene	
14	35.70	1,513	1,512	0.29	γ -cadinene	
15	36.03	1,524	1,522	3.00	δ -cadinene	
16	36.94	1,549	1,549	1.71	elemol	
17	37.83	1,598	1,576	1.59	β -copaene	
18	39.93	1,645	1,643	0.86	α -ylangene	
19	40.33	1,727	1,656	1.07	guaiol acetate	terpenoid esters
20	41.46	1,805	1,692	3.04	tau-cadinol acetate	

aRT - Retention time. bRI - Retention index of references.

cRI - Retention index calculated from retention times relatives to that of the n-alkane series.

d% - Compound percentages.

Table 5. Bacteria susceptibility towards different antibiotics.

Antibiotics (\emptyset mm)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	AgrA	AgrB	AgrC	MRSA	<i>S. aureus</i>
Chloramphenicol (C, 30 μ g)	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Ciprofloxacin (CIP, 5 μ g)	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Gentamicin (CN, 10 μ g)	R	ST	ST	RT	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Penicillin G (P, 10 μ g)	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *
Tetracycline (TE, 30 μ g)	RT	RT	RT	RT	RT	R	ST	ST	ST	ST	ST
Cotrimoxazole (COT, 25 μ g)	ST	ST	ST	ST	RT	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Amoxicillin (AMX, 30 μ g)	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *	R *
Oxacillin (OX, 1 μ g)	RT	RT	RT	RT	RT	R	ST	ST	ST	ST	ST
Amikacin (AK, 30 μ g)	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Norfloracin (NX, 10 μ g)	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Cefazolin (CZ, 30 μ g)	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	ST
Rifampin (RA, 5 μ g)	RT	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Pristinamycin (PT, 15 μ g)	RT	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST

RT - Resistant, ST - Sensitive, R * - Natural resistance.

Table 6. Effect of SMEO on slime production.

Conc. (mg/mL)	S01	S02	S03	S04	S05	S06	AgrA	AgrB	AgrC	MRSA	<i>S. aureus</i>
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) - Slime inhibition, (+) - Slime production, Conc. - concentration.

Table 7. Free binding energies with the amino acid interactions of the bioactive compounds from *S. molle* EO in the active sites of AgrA.

Compounds	ArgA (ID; 4G4K)		
	free binding energy	hydrogen interactions	hydrophobic interactions
α -Pinene	-5.3	-	Phe203 - Tyr229 - Leu175
Sabinene	-5.4	-	His200
β -Myrcene	-4.7	-	Ser202 - His200 - Phe203 - Tyr229 - Asp158 - Asp176 - Leu175 - Arg178 - Asn177
α -Phellandrene	-5.6	His200	Arg178 - Asn177 - Ser231 - Arg218 -
<i>o</i> -Cymene	-5.5	Tyr229	Phe203 - Asp158 - Leu175
Limonene	-5.6	-	Tyr153 - Lys225
β -Elemene	5.6	-	Tyr229 - His200 - Leu175
α -Gurjunene	-7.6	-	Arg178 - Leu175 - Asp158 - Tyr229 - Glu163 - Lys167 - Phe203 - Ser202 - His200 - Asn177 - Asp176
Caryophyllene	-7.1	-	Phe203 - Leu175 - Tyr229 -
Humulene	-7.3	-	Leu175 - Tyr229 - Phe203
γ -Muurolene	-7.2	-	Tyr229 - Asp176 - Leu175 - Asn177 - His200 Ser202 - Phen203 - Glu163 - Cys228
β -Cyclogermacrane	-7.2	-	Phe203 - Tyr229 - Leu175
α -Muurolene	-7.2	-	Phe203 - Asp176 - Arg178 - Asp158 - Leu175 - Tyr229
γ -Cadinene	-7.4	His200	Arg178
δ -Cadinene	-7.2	-	Leu175 - Val154 - Arg178 - Tyr229 - His227 - Phe203
Elemol	-6.6	-	Val154 - Arg178 - His227 - Tyr229 - Leu175
β -copaene	-7.8	-	Leu175 - Tyr229 - Arg178
α -ylangene	-7.3	-	Leu189 - Ile143 - Leu192
Guaiol acetate	-7.9	-	Tyr229 - Arg178 - Leu175 - His227 - Phe203 - His200
Tau-Cadinol acetate	-7.5	Thr166	Lys167 - His227 - Leu175 - Tyr229

Effect of SMEO on biofilm production

The *S. aureus* biofilm inhibition was assessed by a quantitative crystal violet test. As shown in Figure 5b. The SMEO inhibitory impact on *S. aureus* biofilm

production indicates a dose-dependent inhibition in the concentration between 100 and 200 mg/mL. The S03 and S06 strains are more sensitive, while S04 shows weak inhibition at the 12.5 mg/mL dose. The Agr sys-

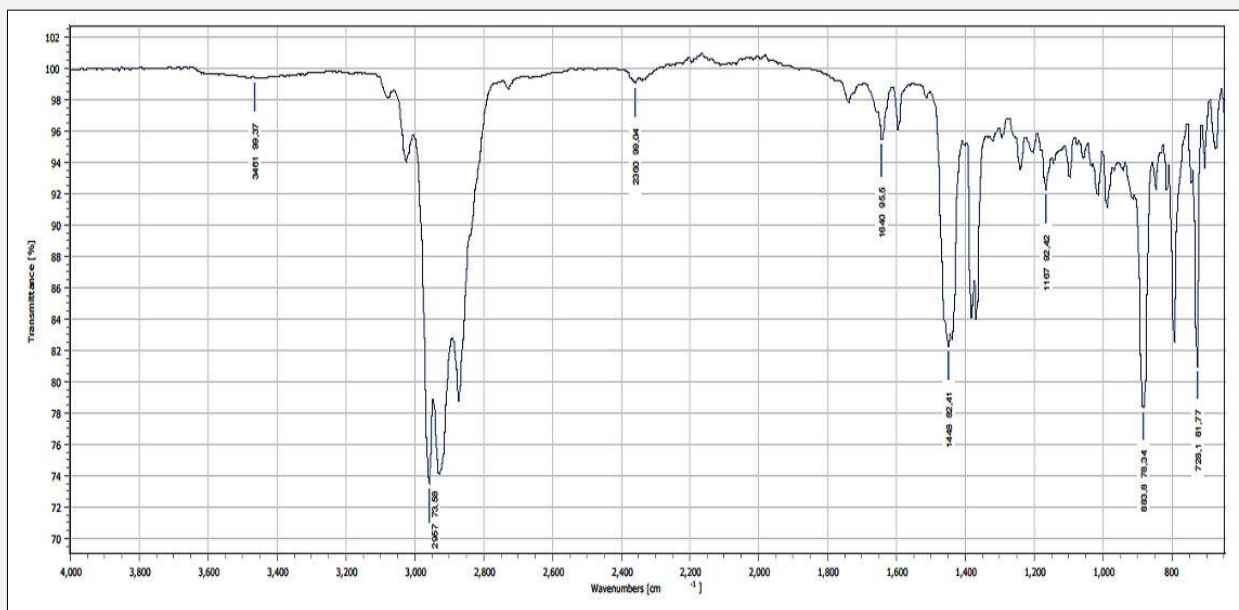


Figure 1. FTIR spectrum of the SMEO.

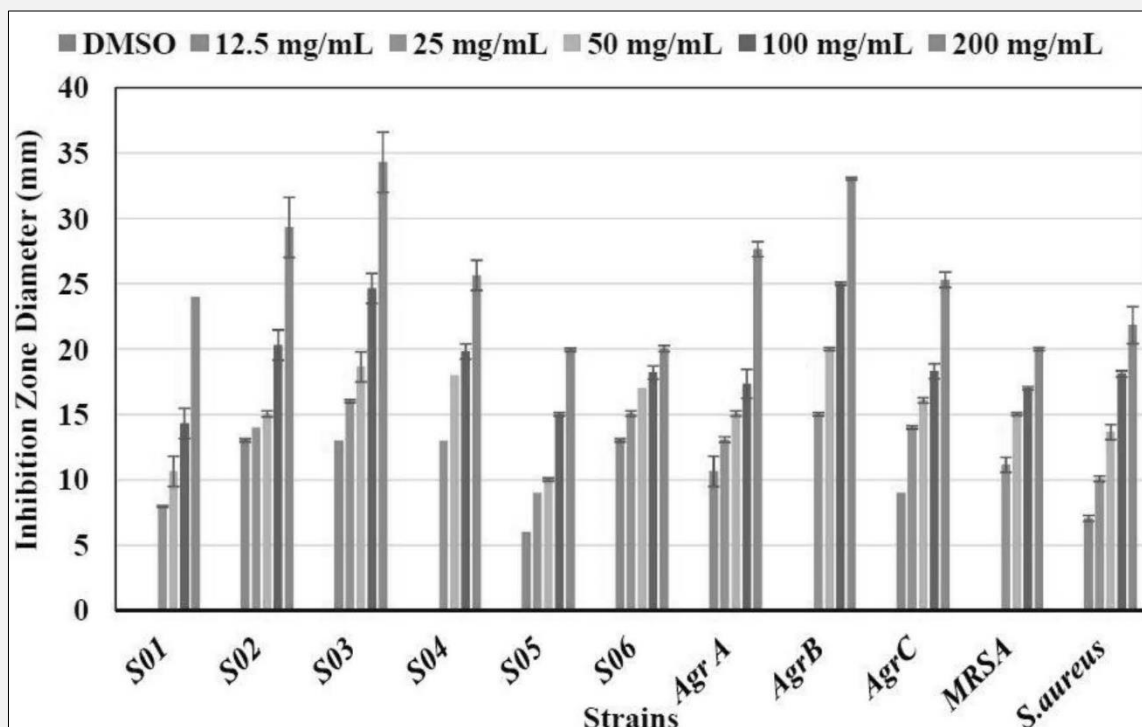


Figure 2. Antibacterial disc diffusion activity of SMEO.

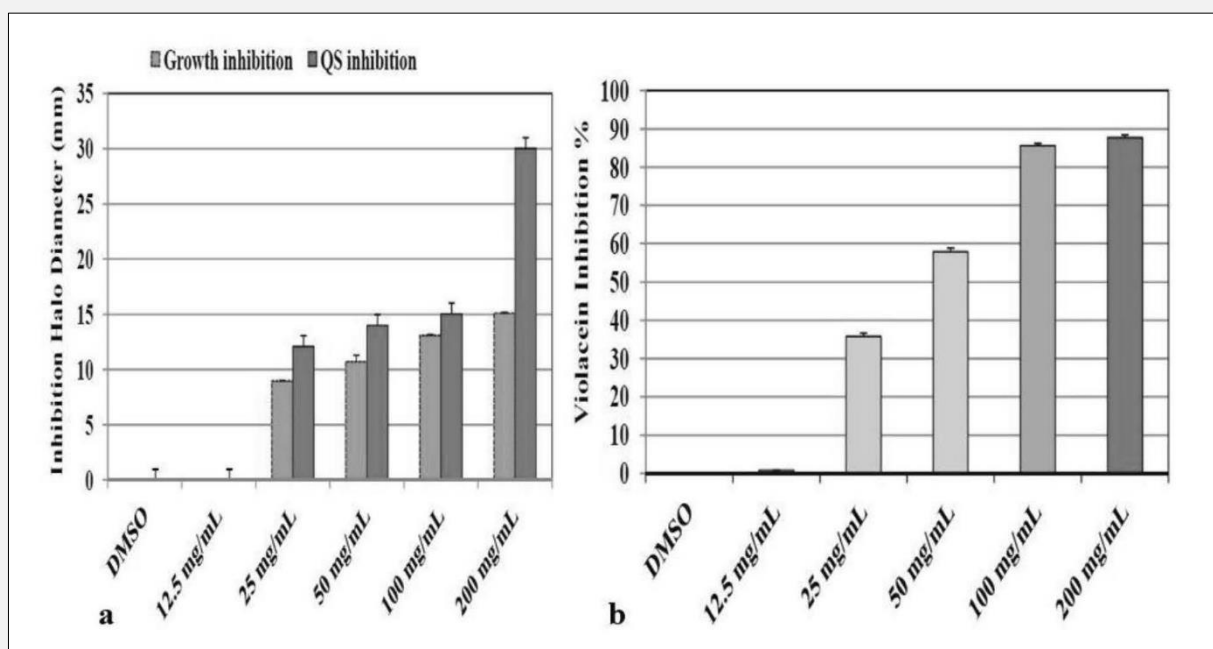


Figure 3. a - QS inhibition and antimicrobial halos of SMEO, b - Percentage of violacein inhibition by the SMEO.

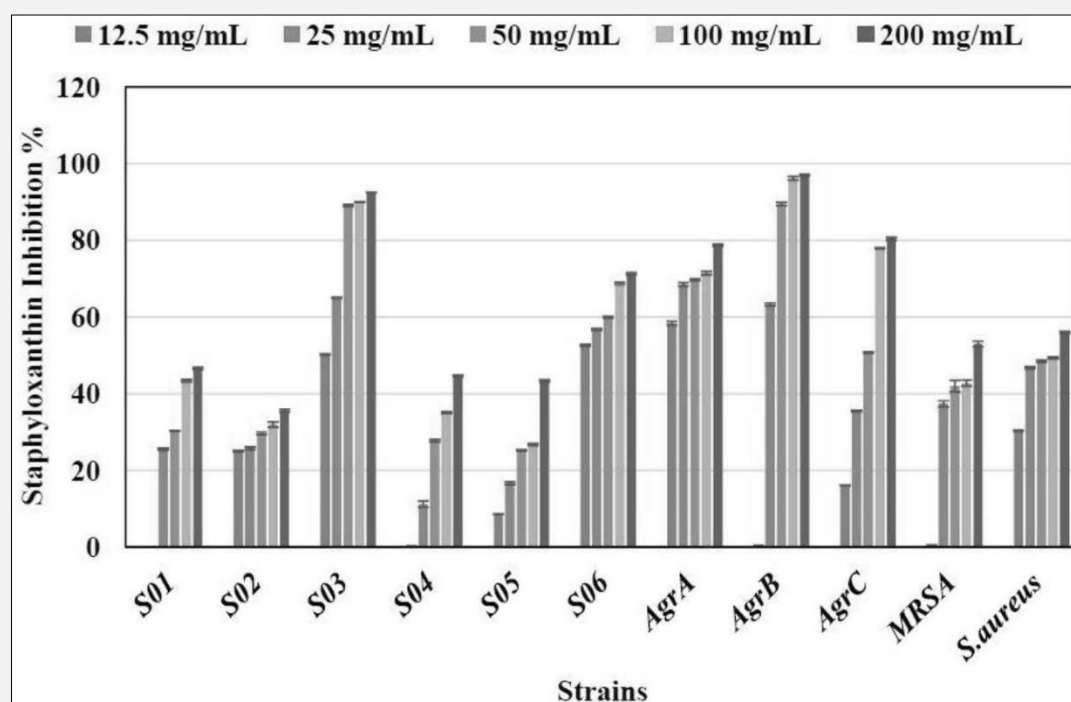


Figure 4. Effect of SMEO on Staphyloxanthin production.

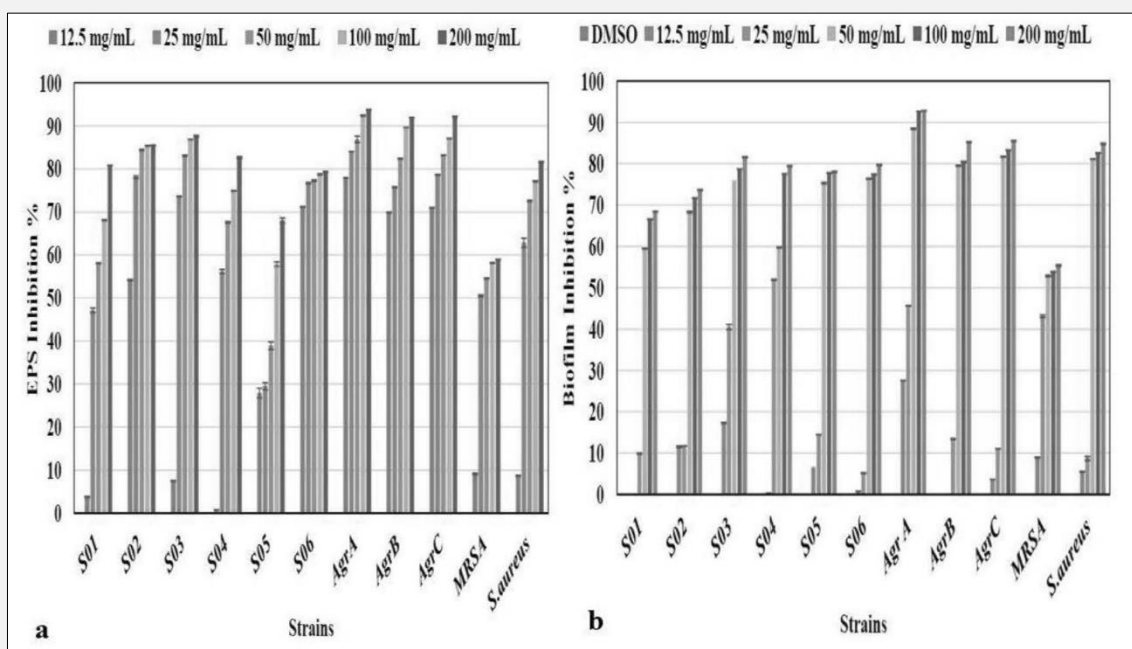


Figure 5. a - Effect of SMEO on EPS production in *S. aureus*, b - Biofilm inhibition at different concentrations of SMEO.

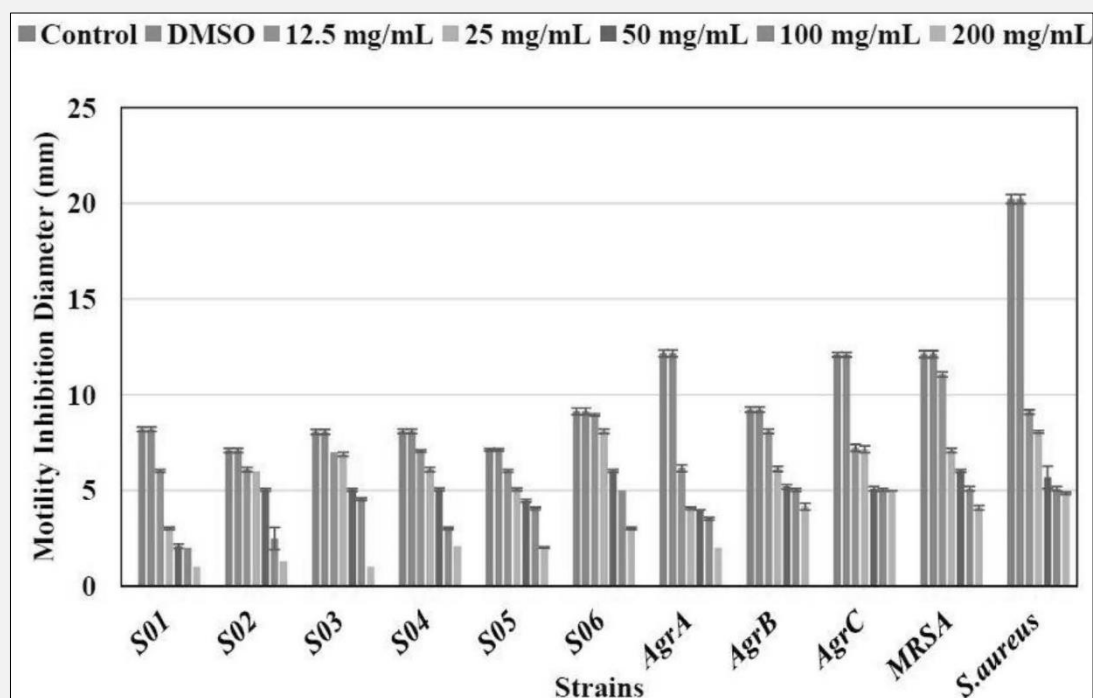


Figure 6. Inhibitory effect of SMEO on *S. aureus* motility.

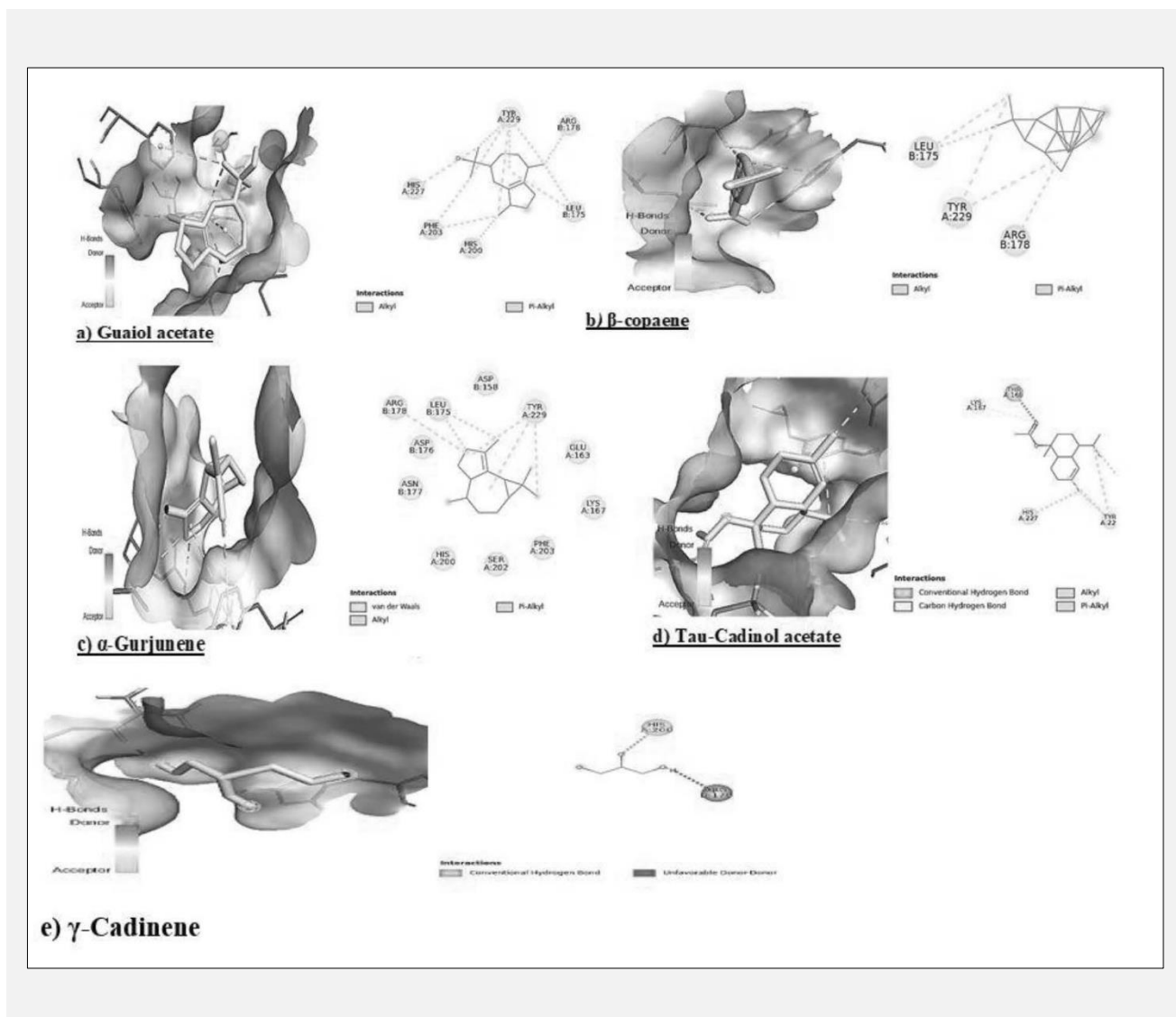


Figure 7. Binding mode of AgrA using molecular docking.

2D (right) and 3D (left) - depiction of the binding modes of the top five ligands to the active pocket of the AgrA operon (PDB code: 4G4K). a - guaiol acetate, b - β -copaene, c - α -gurjunene, d - tau-cadinol acetate, e - γ -cadinene.

tem mutants show variations; AgrA was highly sensitive while AgrB and AgrC did not exhibit inhibition at low concentrations. The MRSA strain, resistant to methicillin, is less sensitive. The outcomes displayed a significant inhibition in biofilm development with maximum level of inhibition 92.87% ($p < 0.01$) at 200 mg/mL.

Inhibition of motility

Figure 6 displays the type and diameter of the motility pattern regions. The capability of SMEO to retard the sliding motility pathways of *S. aureus* was also assessed.

Molecular docking of the interaction of SMEO with AgrA of *S. aureus*

Results of the molecular docking study showed that SMEO interacts with AgrA of *S. aureus*. The molecular docking investigations evaluated the binding affinities of 20 compounds from *S. molle* essential oil with the target protein ArgA (PDB code: 4G4K). The employed software generates up to eight conformers. This conforms to the most negative energy, which was taken as the highest simulation for the tested compound (Table 9).

As can be noted, the docked compound Guaiol acetate showed the maximum bonding affinity with FBE equal to -7.9 Kcal/mol, followed closely by B-copaene (-7.8

Kcal/mol), gurjunene (-7.6 Kcal/mol), tau-cadinol acetate (-7.5 kcal/mol). On the other hand, other notable compounds, such as γ -cadinene (-7.4 kcal/mol), humulene (-7.3 Kcal/mol), and α -muurolene (-7.2 kcal/mol), also showed a strong binding affinity (Figure 7).

In contrast, the remaining compounds displayed lower free binding energies. Based on the high binding scores detected within the top five compounds, additional analyses of the binding mode interactions with the active site were conducted. It is well-documented that hydrogen bonding plays a critical role in stabilizing ligand-protein interactions. From the obtained results α -phellandrene and γ -cadinene showed hydrogen bond formation with His200, and weak, non-covalent interactions with residues Arg178, Asn177, Ser231, and Arg178. While tau-cadinol acetate formed hydrogen bonds with residue Thr166. Despite the low binding energy of o-cymene (-5.5 Kcal/mol), a hydrogen bond was formed with the residue Tyr229. Other residues frequently involved in interactions across multiple compounds include Phen203, Tyr229, Leu175, Phen203, His200, and Arg178. The highest docked ligand exhibited strong hydrophobic interactions with residues Tyr229, Arg178, Leu175, His227, and Phen203.

DISCUSSION

The spreading and rising of antibiotic resistance phenomenon worldwide threatens human health. *S. aureus* secrete different virulence factors including Staphyloxanthin, EPS, slime and biofilm formation which were regulated by the quorum sensing system.

Several studies reported that essential oil of *S. molle* has therapeutic potential against infectious diseases caused by *S. aureus*. In this context, to clear up the potential mode of the EO antibacterial activity against *S. aureus*, evaluation of several parameters such as quorum sensing inhibition, virulence factors were assessed. Finally, this study has been accomplished by molecular docking of the interaction of SMEO with AgrA of *S. aureus*.

The EO yield extracted from the *S. molle* leaves was observed to be $0.71 \pm 0.01\%$ (v/dry weight). Belhoussaine et al. [25] found a higher yield of 1.24% from the leaves of *S. molle* comparing with our results.

The analysis of SMEO by FTIR and GCMS results revealed the occurrence of biologically active compounds such as linalool, α -pinene, limonene, myrcene, terpineol, and eugenol. The SMEO was characterized by the high presence of limonene (35.82%) as the major component, followed by α -phellandrene (19.13%). Several previous studies show that SMEO species belong to α -phellandrene and limonene as major compounds, regardless of the cultivation place [26]. In addition, Belhoussaine et al. [25] found limonene to be the principal component (22.94%) in Moroccan samples.

These discrepancies in the EO's yield and composition could be linked to factors such as differences in extraction techniques, geographical and local environmental

conditions, and genetic variations among plant populations [26].

The *in vitro* antimicrobial assay results against 11 microorganisms indicated that SMEO displayed significant antimicrobial activity against all tested strains ($p < 0.01$). The most susceptible strains were S03 and AgrB which exhibited inhibition zones of 34.33 ± 0.1 mm and 33.06 ± 0.1 mm, respectively, when treated with 200 mg/mL of EO. According to Do Prado et al., [27] the antibacterial effectiveness of SMEO was linked to its active constituents, including B-pinene (25.23%), epi-a-cadinol (21.29%), a-pinene (18.72%), myrcene (11.54%), and sabinene (5.02%). In addition, Rocha et al. [28] demonstrated that SMEO has inhibitor activity against *S. aureus* ATCC25923 suggesting a possible synergy activity between the components (α -pinene, β -pinene, and sabinene).

The SMEO chemical profile displays a robust dominance of monoterpene hydrocarbons, predominantly the limonene and α -phellandrene. As reported by Barra [26], these substances exhibit powerful antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant attributes.

Remarkably, the limonene and α -phellandrene displayed synergistic outcomes that facilitate the SMEO's antimicrobial action, which is supported by their corresponding mechanisms action. Additionally, the trace constituents - o-cymene, α -pinene, α -ylangene and sabinene - have the ability to strengthen this interaction, increasing the biological actions spectrum.

The SMEO's QS inhibitory capability was measured by employing disk diffusion assays in the QS model bacterium *Chromobacterium violaceum* (CECT 494). The outcomes at 200 mg/mL indicated that the QS inhibition halos were significantly greater than the antibacterial halos (30.03 ± 0.15 mm and 15.1 ± 0.1 mm, respectively). These findings further highlighted that the SMEO establishes a stronger QS inhibitory action, when compared to its antibacterial behavior. These results were consistent with previous findings of Pellegrini et al. [7], who observed similar trends when using pure EO (50 ± 1.2 mm and 24 ± 0.8 mm, respectively). The SMEO presented a substantial decline in violacein formation, achieving an $87.73 \pm 0.69\%$ decrease at a strength of 200 mg/mL; however, no notable reduction was witnessed at 12.5 mg/mL. This study's findings are consistent with those of Pellegrini et al. [7], who emphasized the enhanced efficacy of the SMEO at higher concentrations, a 50% reduction in violacein formation at a level of 0.005% EO. The presence of non-pigmented zones around wells containing varying EO concentrations (200, 100, 50, and 25 mg/mL) further supports its potential anti-QS activity. Additionally, the mutant strains AgrA, AgrB, and AgrC exhibited a pronounced decrease in staphyloxanthin levels as SMEO concentration increased, with AgrA displaying heightened sensitivity. Reductions in staphyloxanthin production were also observed in MRSA and human *S. aureus* strains, though these responses showed greater variability. Among the strains tested (S01 to S06), S03 was notably

more sensitive, exhibiting a significant decline in staphyloxanthin production even at a moderate EO concentration (50 mg/mL). Statistical analysis revealed variations in the responses, particularly in strains such as AgrC and S03. In corroboration with our findings, the study of Lima et al. [29] showed a reduction in staphyloxanthin production in *S. aureus* with 48.78% to 82.88% by *Schinus terebinthifolia*.

The disruption of staphyloxanthin production in altered strains AgrA, AgrB, and AgrC depicted that EO has substantial impact on the QS mechanism in *S. aureus*. This controls virulence factor (such as staphyloxanthin) formation. According to Yamazaki et al. [30], the Agr system is a crucial QS route in *S. aureus*, which controls the manifestation of various virulence attributes in reaction to bacterial population density.

The susceptibility of these mutants to SMEO is an indication of a disturbance in the Agr signaling route, possibly by inhibiting AgrA activation or disrupting quorum sensing communication. The bioactive compounds present in the SMEO - terpenoids and phenolic compounds - has clinically established antimicrobial and anti-quorum sensing properties. These compounds have the capacity of inhibiting Agr system activation, primarily either by disrupting the binding process of the auto-inducing peptides (AIPs) to their receptors, or through influencing AIP synthesis and stability, which in turn reduces staphyloxanthin production. This disruption may also alter membrane fluidity, as the absence of staphyloxanthin has been shown to impact membrane properties, increasing the vulnerability of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) cells to membrane-targeting antibiotics. Moreover, EPS plays a vital part in structural composition of biofilms and microcolonies formation, thereby, providing resistance to the biofilms pathogens through blockage of antibiotic penetration [31].

Furthermore, this study's outcomes highlight the impact of SMEO on EPS production. Specifically, it was noted that a substantial decrease in EPS production occurred at a concentration of 200 mg/mL, with inhibition rates of $93.78 \pm 0.03\%$ for AgrA, $92.17 \pm 0.10\%$ for AgrC, and $91.92 \pm 0.06\%$ for AgrB. Likewise, the results strongly portrayed that SMEO is a potent inhibitor of EPS production in *S. aureus* and has a strong correlation with the EO concentration. The varying sensitivity observed among the different strains, especially the Agr mutants, emphasizes SMEO as a prospective targeted anti-biofilm agent. Scherr et al. [32] demonstrated that EPS performs crucial roles in shielding the cells from environmental stress and degradation. This is because it traps cells within the matrix and blocks the penetration of molecules, providing resistance to antibiotics, even in higher proportions. Furthermore, Lan et al. [17] pointed out that when pathogens are encased in the EPS matrix, the host immune system struggles to detect them, effectively shielding the pathogens from host defense mechanisms.

Biofilms enable bacteria to resist antimicrobial treatments and defend them against the host immune sys-

tem's response [33]. Previous findings revealed that bacteria have more resistance to antimicrobials than planktonic bacteria in the biofilm [33]. Hence, the anti-biofilm activity was accessed using the O'Tool method. The SMEO inhibits the biofilm development with maximum level of 92.87%. The results validated the interference of SMEO in biofilm formation. In agreement with our results, Cutro et al. [34] reported the inhibition of biofilm formation in *S. aureus* using *Schinus areira* essential oil.

Bacterial motility is a crucial adaptation that facilitates survival, dissemination, surface colonization, and host invasion while contributing to antibiotic resistance and coordinated group behaviors. This factor plays a pivotal role in the pathogenicity of many pathogenic bacteria [35]. Though *S. aureus* was habitually considered to be a non-motile microorganism, recent research findings have exposed its mobile capacity [36, 37]. The observed movement arises from water buildup within the group, and the formation of biosurfactants, such as phenol-soluble modulins (PSMs), which lower surface tension and enhance motility [37, 38]. Particularly, the Agr QS system, which comprises of AgrA, AgrB, AgrC, and AgrD, has been acknowledged as a substantial regulator of motility-related elements, such as PSMs [37].

Results from this work show the peculiar SMEO effects on both *S. aureus* wild-type and mutant strains' motility, particularly when they were evaluated at concentrations ranging from 12.5 mg/mL to 200 mg/mL. In the control group (no EO application), all the pathogen strains demonstrated motility, with *S. aureus* and S06 recording the highest levels. Consistent with prior research observations, Agr mutant strains (AgrA, AgrB, and AgrC) exhibited a lower degree of motility, which affirmed Agr importance in controlling surfactant production and motility procedures.

Interestingly, all the strains exhibited a dose-dependent reduction in motility. Similarly, as the SMEO concentration increased, there was a substantial decrement in the motility level, with the most significant inhibition level documented at the 200 mg/mL concentration. Agr mutant strains demonstrated increased sensitivity to the inhibitory effects of the essential oil at all levels, likely due to their compromised regulation of surfactant production. In contrast, wild-type strains, such as S01, S02, S06, and *S. aureus*, experienced a smaller reduction in motility, especially at lower concentrations - 50 and 25 g/L. Notably, *S. aureus* maintained higher levels of motility when exposed to the essential oil, suggesting that the Agr system may offer some amount (level) of protection against the inhibitory actions of the essential oil.

The Agr operon in *S. aureus* serves as an agent of a regulatory mechanism, mainly in the situation where transcription factors restrain the expression of target genes in reaction to environmental cues [38]. Based on this context, the AgrA operon was chosen for in silico analysis because of its essential function in regulating quorum sensing, which is a significant contributor to bacte-

rial virulence and biofilm development. The results documented in this research portrayed that all the compounds identified were able to demonstrate the ability to hinder the target receptor (AgrA) with promising binding affinities. For instance, guaiol acetate, β -copaene, α -gurjunene, and tau-cadinol acetate appeared as potential compounds based on their smaller binding abilities, and stronger collaborations with key amino acid remnants in the active site. Some residues such as Tyr229, Leu175, Phe203, and Arg178 were also recurrently involved in ligand interactions across the high-affinity compounds. The latter may have essential contributions in ligand recognition, thus making them essential targets for drug design strategies. Furthermore, the hydrogen bonding (His200, Thr166, Tyr229), further increases the specificity and stability of binding. It is worth noting that the molecular docking results correlate positively with the experimental findings, thus adding strength to the proof of the inhibitory effect of the tested compounds against the operon AgrA.

Considering the obtained results of the listed compounds, it appears that guaiol acetate might be the reason behind the quenching effect of SMEO against numerous virulence factors - biofilm and quorum sensing. For instance, a clinical investigation piloted by Khan et al. [39] demonstrated the *in vitro* anti-QS activity of guava leaf extracts, which contain guaiol among other compounds. On the other hand, *in-silico* docking studies suggest that these compounds are capable of binding the Quorum Sensing (QS) receptors, thus preventing the receptors from making AHL and destroying these protein receptors. Inhibition of QS could also be achieved by several other mechanisms including inhibiting auto-inducer synthesis, transport or secretion, antagonism, and inhibition of targets downstream of AHL receptor binding [40,41]. In this data, we observed that *S. aureus* mutant strains were more sensitive than wild type strains. This emphasizes the Agr system's crucial role in regulating bacterial virulence and resistance.

This outcomes of this study showed the discrepancy influence of SMEO on *S. aureus* movement, with the cultures lacking Agr having more inhibition susceptibility. The dose-dependent characteristics of this inhibition underscore the significant role of SMEO as a powerful agent affecting motility and biofilm formation in Agr-deficient strains of *S. aureus*. The current work stresses the antibacterial, antibiofilm, and anti-QS potency of SMEO against *S. aureus*. Additionally, more research is needed to provide robust information and disclose the molecular mechanisms behind this variation in response and to investigate the involvement of the Agr system in modulating resistance to environmental stressors. The findings of the molecular research portray the promising role of SMEO as a potential source of natural compounds with anti-quorum sensing action against the pathogenic bacterium *S. aureus*. This will encourage the investigations for new natural drugs, which will have the capability of combating bacterial infections.

CONCLUSION

The present work focuses on the prospect of *Schinus molle* essential oil (SMEO) as a promising alternative to antibiotics against *Staphylococcus aureus* wild type and mutant strains. The SMEO exhibited significant bactericidal and antivirulence activities by interfering with quorum sensing (QS)-regulated traits, such as virulence factor production, staphyloxanthin, slime, EPS, motility, and biofilm formation in both *S. aureus* wild type and mutant strains. Molecular docking investigation validated the association of SMEO with AgrA regulatory quorum sensing in SA, reinforcing its antibiofilm and antivirulence effects. These data highlight SMEO as a promising major component for the development of potent drugs, mainly with the capacity in combating multi-drug resistant *S. aureus* infections.

Acknowledgment:

The authors extend their appreciation to Taif University, Saudi Arabia, for supporting this work through project number (TU-DSPP-2024-10).

Source of Funds:

This research was funded by Taif University, Saudi Arabia, Project number (TU-DSPP-2024-10).

Declaration of Interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

References:

1. Algammal AM, Hetta HF, Elkesh A, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect Drug Resist* 2020 Sep;13:3255-65. (PMID: 33061472)
2. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019 Apr;17(4):203-18. (PMID: 30737488)
3. Alfouzan WA, Boswihi SS, Udo EE. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Tertiary Care Hospital in Kuwait: A Molecular and Genetic Analysis. *Microorganisms* 2023 Dec;12(1):17. (PMID: 38276187)
4. Do Rosário Martins M, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol* 2014; 151(1):485-92. (PMID: 24231069)
5. Heilmann S, Krishna S, Kerr B. Why do bacteria regulate public goods by quorum sensing? How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation. *Front Microbiol* 2015 Jul; 28(6):767. (PMID: 26284049)

6. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2016 Aug; 14(9): 576-88. (PMID: 27510864)
7. Pellegrini MC, Alvarez MV, Ponce AG, Cugnata NM, De Piano FG, Fuselli SR. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research* 2014 Aug;26(6):458-65. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.947387>
8. Lakshmi SA, Bhaskar JP, Krishnan V, et al. Inhibition of biofilm and biofilm-associated virulence factor production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by docosanol. *J Biotechnol* 2020 Jun 20;317:59-69. (PMID: 32353392)
9. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr* 2019 Apr; 7(2):10.1128. (PMID: 30953424)
10. Moussa HH, Sara B, Benhalima H, Benaliouche F, Sbartaï I, Sbartaï H. Chemical characterization of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) leaf essential oil and evaluation of its antifungal, antibacterial and antioxidant activities. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2025 Jan 12;70(12):1-9. (PMID: 39799503)
11. El Orche A, El Mrabet A, Said AAH, et al. Integration of FTIR Spectroscopy, Volatile Compound Profiling, and Chemometric Techniques for Advanced Geographical and Varietal Analysis of Moroccan Eucalyptus Essential Oils. *Sensors (Basel)* 2024 Nov 17;24(22):7337. (PMID: 39599114)
12. Erenler R, Pabuccu K, Yaglioglu AS, Demirtas I, Gul F. Chemical constituents and antiproliferative effects of cultured *Mougeotia nummuloides* and *Spirulina major* against cancerous cell lines. *Z Naturforsch C J Biosci* 2016 Mar; 71(3-4):87-92. (PMID: 26985685)
13. Daka D, G/Silassie S, Yihdego D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012 Sep 17;11: 26. (PMID: 25927182)
14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012 Mar;18(3):268-81. (PMID: 21793988)
15. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 Jan;29(1):81-8. (PMID: 19899011)
16. Truchado P, Gil-Izquierdo A, Tomás-Barberán F, Allende A. Inhibition by Chestnut Honey of N -Acyl- 1 -homoserine Lactones and Biofilm Formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009 Dec 9;57(23):11186-93. (PMID: 19950997)
17. Lan L, Cheng A, Dunman PM, Missiakas D, He C. Golden Pigment Production and Virulence Gene Expression Are Affected by Metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2010 Jun; 192(12):3068-77. (PMID: 20400547)
18. Lee KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol* 2015 Oct 27;6:1174. (PMID: 26579084)
19. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989 Aug; 42(8):872-4. (PMID: 2475530)
20. Viswapriya D, Subramenium GA, Prithika U, Balamurugan K, Pandian SK. Betulin inhibits virulence and biofilm of *Streptococcus pyogenes* by suppressing ropB core regulon, sagA and dltA. *Pathog Dis* 2016 Oct; 74(7):ftw088. (PMID: 27596811)
21. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998 May; 28(3):449-61. (PMID: 9632250)
22. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 2010 Sep;8(9):634-44. (PMID: 20694026)
23. Zellagui DR, Chems A el K, Hadjab W, et al. Chemical composition, antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities, *in vitro* and *in silico*, of the essential oil of Algerian endemic species *Daucus biseriatus* Murb. *Int J Environ Health Res* 2024 Dec 22:1-15. (PMID: 39710851)
24. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2024). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 34^{ème} Ed. M2-M11, Wayne, Pennsylvanie, Etats-Unis: Clinical and Laboratory Standards Institute. https://www.darvashco.com/wp-content/uploads/2024/07/CLSI-2024_compressed-1.pdf
25. Belhoussaine O, El Kourchi C, Harhar H. Chemical Composition, Antioxidant, Insecticidal Activity, and Comparative Analysis of Essential Oils of Leaves and Fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022 May 30;2022:4288890. (PMID: 35677362)
26. Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Nat Prod Commun* 2009 Aug; 4(8):1147-54. (PMID: 19769002)
27. Do Prado AC, Garces HG, Bagagli E, et al. *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. *J Appl Microbiol* 2019 Feb; 126(2): 516-22. (PMID: 30431699)
28. Rocha P, Rodilla J, Díez D, et al. Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules* 2012 Oct;17(10):12023-36. (PMID: 23085653)
29. de Souza Feitosa Lima IM, Zagnignan A, Santos DM, et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (StELL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. *Sci Rep* 2019 Dec 3;9(1):18159. (PMID: 31796807)
30. Yamazaki Y, Ito T, Tamai M, Nakagawa S, Nakamura Y. The role of *Staphylococcus aureus* quorum sensing in cutaneous and systemic infections. *Inflamm Regen* 2024 Mar 1; 44(1):9. (PMID: 38429810)
31. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005 Jan;13(1):34-40. (PMID: 15639630)
32. Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol* 2014 Feb 5;5:37. (PMID: 24550921)
33. Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2014 Apr;18:96-104. (PMID: 24657330)
34. Cutro AC, Coria MS, Bordon A, Rodriguez SA, Hollmann A. Antimicrobial properties of the essential oil of *Schinus areira* (Aguaribay) against planktonic cells and biofilms of *S. aureus*. *Arch Biochem Biophys*. 2023 Aug;744:109670. (PMID: 37336342)

35. Matilla MA, Krell T. The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev* 2018 Jan 1; 42(1). (PMID: 29069367)
36. Kaito C, Sekimizu K. Colony Spreading in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2007 Mar;189(6):2553-7. (PMID: 17194792)
37. Tsompanidou E, Denham EL, Becher D, et al. Distinct Roles of Phenol-Soluble Modulins in Spreading of *Staphylococcus aureus* on Wet Surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2013 Feb; 79(3):886-95. (PMID: 23183971)
38. Aubourg M, Pottier M, Léon A, et al. Inactivation of the response regulator AgrA has a pleiotropic effect on biofilm formation, pathogenesis and stress response in *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiol Spectr* 2022 Feb 23;10(1):e0159821. (PMID: 35138170)
39. Khan MH, Dar NA, Alie BA, et al. Unraveling the Variability of Essential Oil Composition in Different Accessions of *Bunium persicum* Collected from Different Temperate Micro-Climates. *Molecules* 2023 Mar 6;28(5):2404. (PMID: 36903647)
40. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum Sensing and Phytochemicals. *Int J Mol Sci* 2013 Jun 17;14(6):12607-19. (PMID: 23774835)
41. Hadjab W, Zellagui A, Mokrani M, et al. Propolis Biomolecules Attenuates Virulence Factors of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: In Vitro and In Silico Investigation. *Sci Adv Mater* 2024 Jun;16:532-45.
<https://doi.org/10.1166/sam.2024.4580>

Research Article

Soumia Tabti*, Djamil Boukraâ, Amina Itatahine, Pilar Truchado, Kaddour Miloudi, Ramazan Erenler, Rokayya Sami*, Suha H. Abduljawad, Ahmed Basri, Fayez Alsulaimani, Roqayah H. Kadi, Afnan M. Alnajeebi and Amal Alyamani

Targeting QS-mediated virulence in *Staphylococcus aureus* using *Eucalyptus globulus* essential oil: from chemistry to molecular docking

<https://doi.org/10.1515/chem-2025-0201>

Received June 2, 2025; accepted September 5, 2025;

published online January 16, 2026

Abstract: Nowadays, there is a huge challenge linked to multi drugs resistant issue; therefore, researchers are seeking alternatives to antibiotics, such as plants essential oils and extracts. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a pathogenic bacterium, which is associated with several chronic illnesses. Therefore, the ongoing research aimed to examine the chemical profile and biological activity (Quorum sensing inhibition and Antivirulence efficacy) of *Eucalyptus globulus* essential oil (EgEO) in inhibiting *S. aureus* survival. EgEO were chemically identified by FTIR and GC-MS assessments. The antibacterial effect of EgEO against the virulent strains was assessed utilizing the disk diffusion method. Eucalyptol (45.20 %) and o-Cymene (25.42 %) were the principal constituents of the studied

EgEO. The EgEO is particularly active against the *S. aureus* strains; with inhibition zones around (50.33 ± 0.57 mm). EgEO is notably able to prevent QS by blocking violacein production in *Chromobacterium violaceum* (CECT 494), and further reducing the EPS production by 95.40 ± 0.14 %, and biofilm formation by 96.58 ± 0.95 %. Likewise, slime production was affected by EgEO. ADMET of EgEO identified phytocompounds are further confirmed as interesting candidates for additional research and evolution of novel antimicrobial agents. Besides, molecular docking revealed excellent interaction of the detected chemical compounds, targeting some known enzymes involved in QS activities. These findings highlighted the possible employ of EgEO against the pathogenic *S. aureus*, and block infection promoting factors regulated by QS mechanism.

Keywords: drug resistant; essential oil; *Eucalyptus globule*; molecular docking; *Staphylococcus aureus*; slime production

*Corresponding authors: Soumia Tabti, Geo-environment and Space Development Laboratory (LGEDE), Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria, E-mail: soumia.tabti@univ-mascara.dz. <https://orcid.org/0009-0000-9376-7769> (S. Tabti); and Rokayya Sami, Department of Food Science and Nutrition, College of Sciences, Taif University, Taif, Saudi Arabia, E-mail: rokayya.d@tu.edu.sa

Djamil Boukraâ, Geo-environment and Space Development Laboratory (LGEDE), Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria, E-mail: boukraadja@yahoo.fr. <https://orcid.org/0000-0002-0842-0793>

Amina Itatahine, Faculty of Natural and Life Sciences, Department of Biological Sciences, Djilali Bounaama University of Khemis Miliana, Khemis Miliana, Algeria, E-mail: a.itatahine@univ-dbk.m.dz

Pilar Truchado, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, Spain, E-mail: ptruchado@cebas.csic.es

Kaddour Miloudi, Laboratory of Biological Systems and Geomatics Research, Mascara University, Mascara 29000, Algeria, E-mail: miloudi.kaddour@univ-mascara.dz

Ramazan Erenler, Research Laboratory Practice and Research Center, Iğdir University, 7600, Iğdir, Türkiye, E-mail: renerler@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-0505-3190>

Suha H. Abduljawad, Department of Clinical Nutrition, College of Applied Medical Sciences, Taibah University, P.O. Box 344, KSA, Medina, Saudi Arabia, E-mail: sabduljawad@taibahu.edu.sa

Ahmed Basri and Fayez Alsulaimani, Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Applied Medical Sciences, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia; and Embryonic Stem Cell Unit, King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia, E-mail: abasri@kau.edu.sa (A. Basri), ffalsulaimani@kau.edu.sa (F. Alsulaimani). <https://orcid.org/0009-0004-8343-7810> (A. Basri). <https://orcid.org/0009-0001-1897-6955> (F. Alsulaimani)

Roqayah H. Kadi and Afnan M. Alnajeebi, Department of Biological Sciences, College of Science, University of Jeddah, Jeddah 21959, Saudi Arabia, E-mail: rhkadi@uj.edu.sa (R.H. Kadi), amalnajeebi@uj.edu.sa (A.M. Alnajeebi). <https://orcid.org/0000-0002-5670-1688> (A.M. Alnajeebi)

Amal Alyamani, Department of Biotechnology, College Sciences, Taif University, P.O. Box 11099, Taif, 21944, Saudi Arabia, E-mail: a.yamani@tu.edu.sa. <https://orcid.org/0000-0001-6086-5071>

1 Introduction

All microbes have virulence characteristics, which allow them to colonize and effectively fight the host's immune system. Pathogens can successfully play these roles – attachment, invasion, and damage to the host body [1]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is regarded as a critical infection agent in humans, inducing health conditions varying from mild infections to severe ailments, such as multiple organs dysfunction [2]. Tong et al. [3] stated that *S. aureus* causes wide range of illnesses which include: respiratory tract, skin and surgical wounds infections, especially in immune compromised individuals. Indeed, *S. aureus* infections are frequent and result in high mortality, a situation that is aggravated by the bacterium's propensity to acquire drug resistance ability [4]. Furthermore, numerous virulence factors such as, staphyloxanthin, hemolysins, leukocidins, proteases, α -toxin, enterotoxins, exotoxin, exfoliative toxins, immune-modulatory factors and coagulase, which are produced by *S. aureus* are well documented [5–8].

Quorum sensing (QS) system enables intercellular communication as a result of the bacteria population increase [9]. *S. aureus* possesses a pathogenicity regulator (Agr) that functions as a population detection mechanism. At higher cell densities, the Agr system becomes stimulated, which facilitates the production of auto inducing peptides (AIPs). These peptides are sensed by receptors, which then initiate the elements of bacterial virulence responsible for causing infection [9–11]. Earlier studies founded that due to the mutation in the Agr, the bacterial virulence elements are decreased [9]. The QS system determines the production of *S. aureus* biofilms, and the secretion of virulence components [12, 13]. Throughout the centuries, humans used essential oils (EOs) derived from many plants to defeat numerous pathogens microorganisms [14, 15]; and they (EOs) intriguing antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic, and sedative qualities [16]. *Eucalyptus globulus Labillis* (*E. globulus*) classified under Myrtaceae family, commonly utilized as therapeutic plants worldwide, owing to its broad range of pharmaceutical properties [17], including, anti-inflammatory, antalgic, anti-oxidant, anti-microbial, viral inhibiting and central nervous system stimulant effects [18, 19].

Therefore, the current research aimed to characterize the active compounds of *E. globulus*, examine the antimicrobial and anti QS of EgEO, in addition to their effects on different virulence factors (Slime, EPS and biofilm formation) against *S. aureus* strains. Moreover, the link between the EgEO composition and *S. aureus* QS system (AgrA), with the molecular docking was detected.

2 Materials and methods

2.1 Materials

The plant was transferred to the laboratory, where the botanical identification was performed. The plant vegetative parts were dried at ambient temperature, ground and the powder obtained was kept in safe containers.

2.2 Preparation of plant essential oil

The *E. globulus* essential oil (EgEO) was extracted using the Hydrodistillation method. About 200 g of dried leaves powder was mixed with 300 mL of distilled water for 3 h. The EgEO yield was calculated and preserved at 4 °C [20, 21].

2.3 EgEO physicochemical properties

The essential oil physicochemical properties were conducted to analyze the quality of the EgEO extracted. The pycnometer (1 ml; 20 °C) was used to determine the relative density. Whereas, Rotator power was acquired by a polarimeter type VISTA C25. Refractometer ABBE were using to determine the Refractive index with a precision of ± 0.0002 , having a reading within 1.3000–1.7000 ranges. All the parameters were assessed using European Pharmacopeia methods [22].

2.4 Fourier transforms infrared (FT-IR) spectroscopy profiling of EgEO

The structural properties of the EgEO were identified, by utilizing the FTIR spectrometric analysis. The spectra were determined, in absorption mode, ranging between $4,000\text{ cm}^{-1}$ and 400 cm^{-1} , using a Shimadzu FTIR 4,700 spectrometer [23].

2.5 Gas chromatography-mass spectrometry profiling of EgEO

The EgEO essential compounds were evaluated using GC-MS instrument with an Agilent GC7890A, coupled with a 5,975 triple axis mass spectrometer. The ionization potential was set at 70 eV. The chemicals compounds presented in the sample were determined using (NIST) library, with mass spectra measured in the 50–550 m/s scanning range [24].

2.6 Microorganisms

Three bacteria (S01, S03, S06) employed in this research, were isolated from human specimens (Semen, Urine and Pus) and identified as *S. aureus*, in addition to three *S. aureus* mutants strains. The biosensor bacteria *C. violaceum* (CECT 494) was utilizing to determine the anti-QS activity of the EgEO.

Bacterial identification was demonstrated using phenotypic and genotype characterization. For this study, the collected strains were examined for colonial morphology in Chapman medium Agar, followed by Gram staining, oxidase and catalase reactions [25]. For final verification, molecular identification was performed.

2.7 Molecular identification with RNA16S sequencing

The isolated strains were identified as *S. aureus* by phenotypic characteristics, were additionally tested for confirmation by 16S rRNA sequence technique. Bacterial DNA extraction was done using Boiling Lysis method at 100 °C for 10 min, and the suspension bacteria were centrifuged at 15,000g for 10 min. The polymerase chain reaction (PCR) primers sequences (Universal primers) were as earlier reported: 27 forward, 5' AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG 3' and End 1492 reverse, 5' TACGGY-TACCTTGTTACGACTT 3' [26]. The PCR test was conducted using Master Cycler gradient PCR (Eppendorf® Master cycler Personal). The amplification program was carried out with following, denaturation cycle: 94 °C for 3 min, in addition to denaturation 30 cycles in 30 s and 94 °C, annealing 50 °C, 30 s and extension 72 °C, 1.5 min, finally elongation 72 °C, 10 min. Then, after accomplishing the PCR cycles, a last extension procedure was implemented at 72 °C for 5 min, utilizing electrophoresis on 1.5 % agarose gel stained with RedSafe™ nucleic acid determines the PCR amplified products. Electrophoresis was conducted at 80 V for 90 min and observed using UV light and GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) as molecular weight marker. Then, applying a PCR QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) in order to purify the PCR products. Besides, implementing the Applied Sanger sequencing par MacroGen (Pays-Bas) undertaken The Sanger sequencing of the amplified 16S rRNA genes. The comparison of the final sequences and those in the genbank database was conducted utilizing the NCBI BLAST program. Finally, the sample sequences were aligned using crustal software, in addition to that, a phylogenetic tree was made.

2.8 Disc diffusion assays

In order to evaluate the EgEO antimicrobial activity, the disc diffusion technique was employed [27]. Briefly, 100 µL of overnight culture was inoculated in Muller–Hinton agar (MHA) plates surface. Sterile filter paper discs impregnated with varying concentration of EgEO (12.5–200 mg/mL), were deposited on the surface of the culture medium, and maintained overnight at 37 °C. Then the inhibitory activity was revealed by determining diameters of the inhibition zones growth.

2.9 EgEO determination MIC (minimal inhibitory concentration)

In order to examine the MIC of EgEO, micro dilution method was assessed [28]. The examination was performed as the following: 96-well microliter plates including 50 µL of *S. aureus*, with 50 µL of MH bouillon, in addition to 50 µL of EgEO at different concentration (pre diluted in DMSO (10 %)). This was incubated for 24 h at 37 °C. The wells were filled solely with bacteria suspension that is considered as standard control. The concentrations that did not result in significant growth inhibition were chosen as sub-MIC for further experiments.

2.10 Anti-Qs activity

2.10.1 Disk diffusion assay

The EgEO effect on quorum sensing activity was assessed utilizing *Chromobacterium violaceum* (CECT 494) by the agar plate's method. Briefly, 100 µL of 24 h culture was inoculated onto the LB agar plates. 6 mm sterile paper disc loaded with varying sub-MIC (MIC/02, MIC/04) of EgEO was placed on the surface medium, and incubated for 24 h at 37 °C. The observation of a transparent halo around the oil-laden disc was considered as QS activity [29].

2.10.2 Quantification of violacein pigment

To check the effect of EgEO on violacein synthesis, quantitative method was assessed. 2 mL of Luria Burtani broth was seeded with 10 µL of CV 494 strain and supplemented with different sub-MIC of EgEO (25 and 50 mg/mL). After incubation for 24 h at 37 °C, the bacterial culture was centrifuged at 6,000g in 10 min to obtain Cell pellets. Thereafter, 500 µL of the DMSO were included to the pellets, the latters were

vortexed and centrifuged at 10,000g for 15 min. After that, the mixture (200 μ L) was inoculated into a 96-well plate. Violacein inhibition was determined at 585 nm [29].

2.11 Antivirulence

2.11.1 EPS production assay

EPS inhibition assay was evaluated using method explained by [30]. 10 μ L of overnight *S. aureus* cultures were inoculated into 24-well microplates including glass slides (5/5). The cultures were incubated with or without EgEO at its sub-MIC at 30 °C for 24 h. Then, the glass slides were cleaned and resuspended in 500 μ L of saline (0.9 %). Subsequently, 500 μ L of 5 % phenol was included to the suspension, in addition to 2,500 μ L concentrated sulfuric acid. The solution was kept in darkness for 60 min, and the absorption was quantified at 490 nm.

2.11.2 Anti-biofilm assay

Crystal violet (CV) test facilitates the assessment of Biofilm formation inhibition by EgEO against the strains. 100 μ L of sub-MIC of EgEO was placed in 96 well plate containing 100 μ L of LB broth. Following, 100 μ L of *S. aureus* overnight culture at 37 °C was added to the wells, and non-treated bacteria and LB broth were considered as positive control. Then, each wall was cleaned using the PBS in order to eliminate the Planktonic bacteria. The bacterial cultures were removed and colored with crystal violet (100 μ L – 0.4 %) for 30 min; and the excess stain was eliminated using distilled water, and with Ethanol (95 %, 200 μ L) to dissolve the CV. The absorption was taken at 590 nm [31].

2.11.3 Slime production assay

To investigate the Slime inhibition of EgEO against *S. aureus*, Congo red agar was used. 5 mL of the Congo red medium were spilled in 6 well microplates. *S. aureus* strains was centrally inoculated in the medium surface, in addition to that, it was incubated for 24 h at 37 °C. Through the absence of the black color around the colonies, the slime was indicated [32].

2.11.4 Light microscopy observation

Inhibition of biofilm formation was performed using Light microscopy observation method as described in Lakshmi et al. [33]. Sterile glass slides were put in 24 well plates containing *S. aureus* with sub-MICs of EgEO and incubated at

37 °C for 24 h. Besides, the glass slides were cleaned and colored with 0.4 % crystal violet; and the light microscope at 400 \times magnification was used in order to examine the stained glass slides.

2.11.5 ADMET profile

In order to investigate the pharmacokinetics of EgEO, detected molecules were studied in Silico. The SMILES format of selected the compounds were collected from PubChem. The adsorption, distribution, metabolism, elimination, and toxicity were collected utilizing software tools. SwissADME database server (<http://www.swissadme.ch/>, accessed on 17 April 2025) and a ProTox-II database server (<http://tox.charite.de/tox/>, accessed on 17 April 2025) [34, 35].

2.11.6 Molecular docking

Molecular docking was performed to highlight the possibility EgEO to inhibit *S. aureus* QS. The starting structure of *S. aureus* AgrA (PDB code 3BS1, resolution 1.60 Å) [36], was collected from the Protein Data Bank, considered the target for docking studies [37]. Bond orders were identified; in addition, hydrogen atoms were introduced. The 3D structures of the ligand derivatives applied in the docking simulations were modeled and enhanced with LigPrep 3.8 by the OPLS3e force field [38]. The SiteMap module identified potential receptor sites in *S. aureus* AgrA, assigning quantitative site-scores based on factors like size, enclosure, exposure, hydrophobicity, hydrophilicity, and hydrogen bond donor-acceptor balance. The top-ranked site was used to generate a receptor grid in Glide, with white spheres marking the protein's surface. The receptor grid box was centered on the active site residues identified by SiteMap. Besides, the grid generation used Van der Waals scaling of 0.8 and a partial charge cutoff of 0.25 [39]. Flexible docking simulations were performed using the single precision (SP) mode, allowing for accurate and efficient calculations, while considering the flexibility of both the protein receptor and the ligands [40, 41]. Docking results, including the interactions between the ligands and *S. aureus* AgrA, were observed by Chimera software [42].

2.11.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean standard deviation (\pm SD) ($n = 3$). SPSS was used for statistical analysis, including Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests. Results were considered significant at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 EgEO chemical characterization

Eucalyptus globulus leaves presented a liquid oil, yellowish in color and a pleasant odor with an extraction yield of 1.87 % (v/w). The physicochemical properties of EgEO were demonstrated in Table 1.

3.2 Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)

The identification results of EgEO compounds by FTIR analyses are presented in Figure 1. The spectrum values were taken from 4,000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} . The results showed characteristic uptake bands that matched its main constituents. A wide peak was identified at 3,461 cm^{-1} , this peak corresponds

Table 1: The physicochemical properties of *Eucalyptus globulus* essential oil (EgEO).

	EgEO	AFNOR standards
Density	0.910 ± 0.002	0.905–0.921
Refractive index	1.471 ± 0.004	1.460–1.476
Hydrogen potential	4.9 ± 0.01	4–6
Acid value	3.20 ± 0.05	0.84–3.74

to the bond elongation of hydroxyl groups, which revealed the detection of alcohols or phenols. This band demonstrate the existence of oxygenated monoterpenes, including 1,8-cineole. The peaks 2,922 cm^{-1} and 2,850 cm^{-1} , align to the asymmetric and symmetric oscillation of the C–H regions in the aliphatic groups. The 1,681 cm^{-1} peak is related with the carbonyl groups (C=O), which can revealed the existence of aldehydes or ketones. An absorption at 1,375 cm^{-1} peak resulting from the bending vibrations of methyl groups (CH_3) typical in several monoterpenes and sesquiterpenes. Peaks in the 1,200–900 cm^{-1} area are assigned to C–O elongation and C–H vibrational bending. These signals are attribute of alcohols, ethers, and esters, further supporting the occurrence of oxygenated terpenes and another constituent including terpinene derivatives. The peaks in the 1,000–650 cm^{-1} region correspond to perpendicular vibrations of C–H bonds association in aromatic and aliphatic compounds, suggesting the presence of aromatic or cyclic terpenoid compounds.

3.3 GC-MS analysis

GC-MS examination marked considerable variability in EgEO chemical composition; 14 compounds were identified (Table 2). Among these, monoterpene hydrocarbons were the predominant group, accounting for 91.43 %, followed by sesquiterpene hydrocarbons at 6.34 %. EgEO oil was characterized by the presence of Eucalyptol (36.78 %) as the

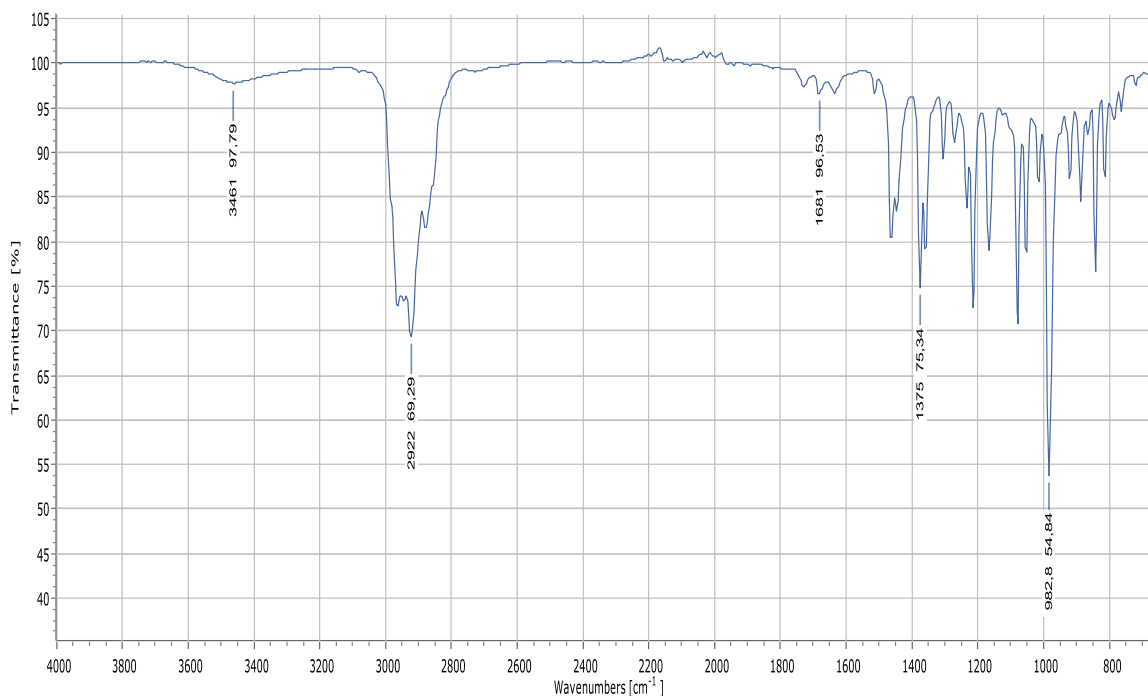


Figure 1: Analysis of EgEO by FT-IR.

Table 2: *Eucalyptus globulus* essential oil (EgEO) chemical composition.

Peak	RT	%	RI (Nist)	RI (Exp.)	Name	Main class
1	10.54	7.78	929	932	α -Pinene	Monoterpene hydrocarbons
2	12.96	0.19	979	987	β -Pinene	Monoterpene hydrocarbons
3	14.48	26.85	1,022	1,022	o-Cymene	Monoterpene hydrocarbons
4	14.66	4.36	1,030	1,026	Limonene	Monoterpene hydrocarbons
5	14.86	36.78	1,032	1,031	Eucalyptol	Monoterpene hydrocarbons
6	16.03	14.93	1,060	1,057	γ -Terpinene	Monoterpene hydrocarbons
7	17.39	0.54	1,088	1,085	Terpinolene	Monoterpene hydrocarbons
8	21.54	0.59	1,177	1,176	4-Terpineol	Monoterpene oxygenated
9	32.89	1.03	1,440	1,438	Aromandendrene	Sesquiterpene hydrocarbons
10	33.74	0.59	1,461	1,461	Alloaromadendrene	Sesquiterpene hydrocarbons
11	35.09	3.42	1,495	1,494	(+)-B-Cyclogermacrene	Sesquiterpene hydrocarbons
12	37.92	1.30	1,536	1,578	Germacrene B	Sesquiterpene hydrocarbons
13	38.13	1.25	1,561	1,584	1(10),11-Eremophiladien-9-ol	Sesquiterpenes oxygenated
14	42.71	0.37	1,675	1,738	Ylangenal	Sesquiterpenes oxygenated

major component, followed by o-Cymene (26.85 %). Other notable components included γ -Terpinene (14.93 %), α -Pinene (7.78 %), Limonene (4.36 %), β -Cyclogermacrene (3.42 %), Germacrene B (1.30 %).

the three strains belongs to *S. aureus* species (Figure 3, Table 3). The strains showed a high degree of homology (96 % of similarity) with *S. aureus* strain AN3 FF (MW175716.1) and AEW1FF (MW175714).

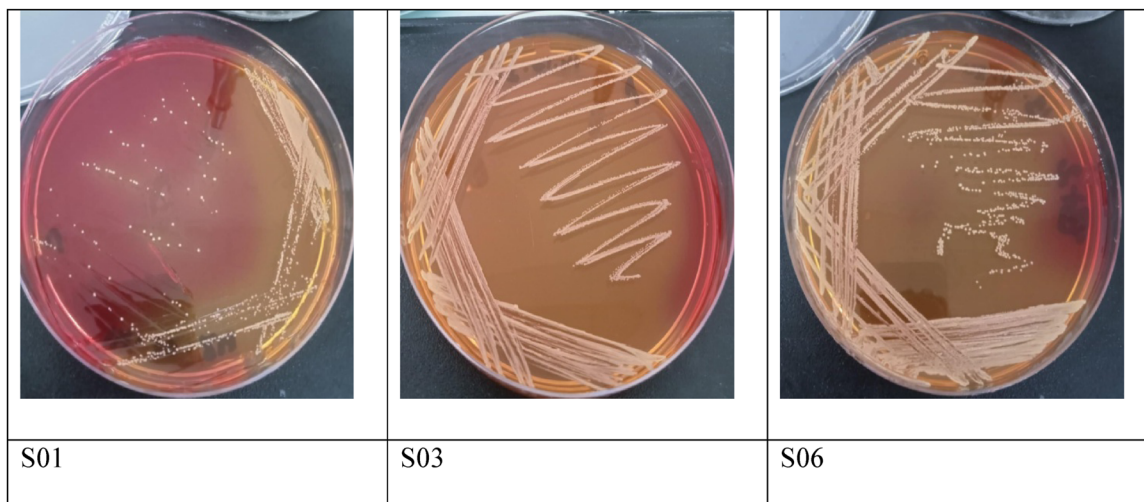
3.4 Phenotypic and genotypic identification

As results, *S. aureus* developed into medium-sized, smooth, golden-yellow colonies on Chapman medium.

Phenotypic identification analysis revealed that the S1, S3 and S6 strains was Gram+ and spherical shape (Figure 2), forming on a Chapman Agar incubated at 37 °C/24 h. Phylogenetic examination of 16S rRNA gene sequence showed that

3.5 Antimicrobial activity of EgEO

The antimicrobial effect of EgEO against *S. aureus* strains was determined using Agar disc diffusion and microdilution method. EgEO exhibited an inhibition effect against both *S. aureus* Wild type and mutants strains (Figure 4). The MIC and sub-MIC (MIC/2, MIC/4) of EgEO were determined as 100, 50 and 25 mg/mL, respectively.

**Figure 2:** Growing of *Staphylococcus aureus* colonies on Chapman medium.

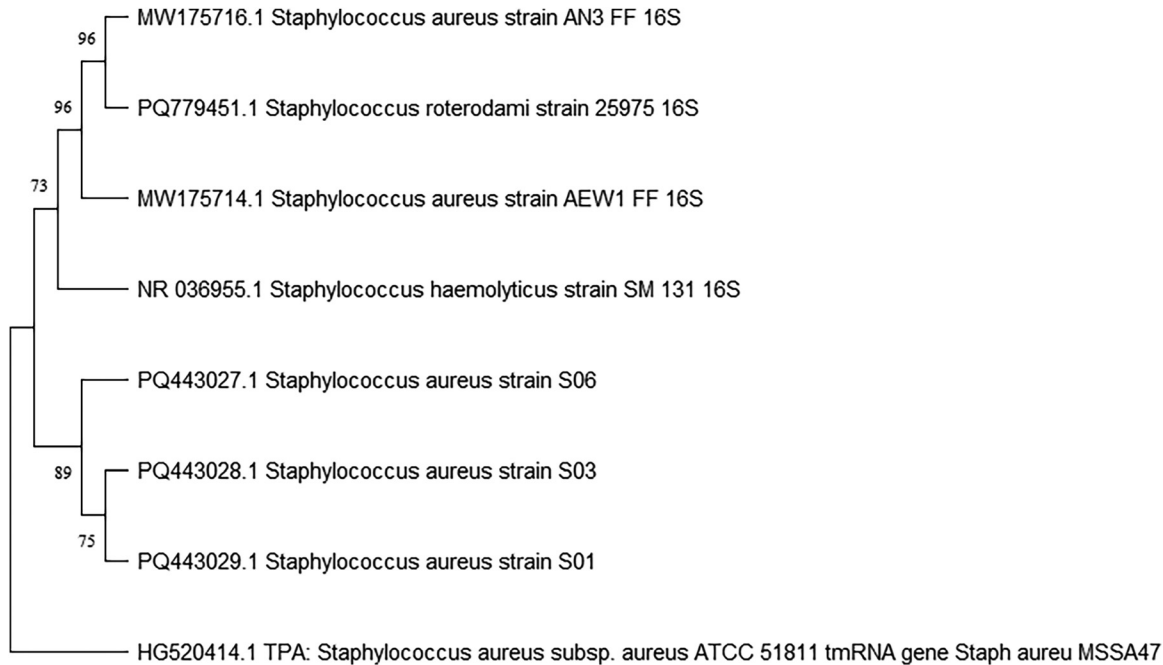


Figure 3: Phylogenetic tree highlighting the position of the three *Staphylococcus aureus* strains relative to other type strains within the Staphylococcaceae.

Table 3: Identification of *Staphylococcus aureus* isolated strains.

Strain	GenBank accession no
S01	PQ443029
S03	PQ443028
S06	PQ443027

3.6 Quorum sensing inhibition (QSI) assays of EgEO

Figure 5 presents the QS inhibition effect of EgEO against *C. violaceum* observed with the absence of pigmentaion around the disk in the sub-MIC (50 and 25 mg/mL). The EgEO at sub-MICs (50 and 25 mg/mL) was used for the anti-QS efficacy against *C. violaceum*.

3.7 Determination of violacein

Figure 6 shows the violacein inhibition results, as they decrease at 83.11 % and 56.09 % in *C. violaceum*, when treated with EgEO at 50 and 25 mg/mL. The violacein inhibition of *C. violaceum* was detected using quantitative method. EgEO showed QS inhibition potential in MIC/2 strong then the MIC/4 without affecting bacteria growth.

3.8 EPS inhibition

The effect of EgEO on the extra polymeric substances (EPS) production in *S. aureus* wild-type and mutant strains is demonstrated in Figure 7. EgEO showed a production in the EPS proucion at the sub-MICs in all the strains.

3.9 Biofilm inhibition

Figure 8 presents the anti-biofilm activity of EgEO. For the purpose to evaluate the ability EgEO to reduce or inhibit bacterial biofilms, *S. aureus* was treated by sub-MIC of EO. EgEO significantly reduced the biofilm formation ($p < 0.05$) of the strains (Figure 8).

3.10 Slime inhibition

The inhibition of slime production is demonstrated in Table 4. The ability of EgEO to reduce slime production of *S. aureus* strains was evaluated by the CRA test. EgEO reduced slime synthesis in both MIC/2 and MIC/4 in all bacteria tested, which was detected by a burgundy red color, shown in Figure 9.

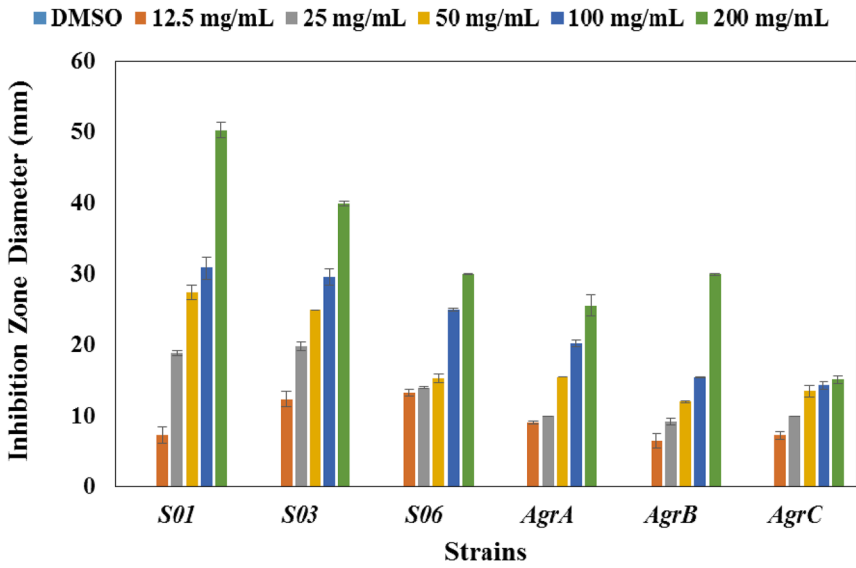


Figure 4: Antibacterial effect of EgEO against *Staphylococcus aureus* wild type and mutants strains.

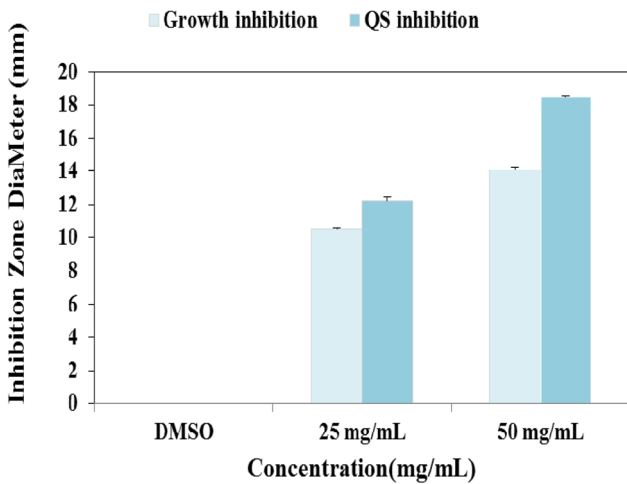


Figure 5: Effect of EgEO (25 and 50 mg/mL) on QS in *Chromobacterium violaceum*.

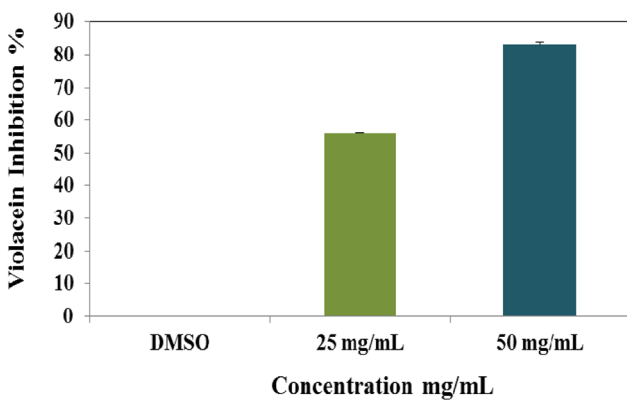


Figure 6: Effect of EgEO (25 and 50 mg/mL) on violacein production in *Chromobacterium violaceum*.

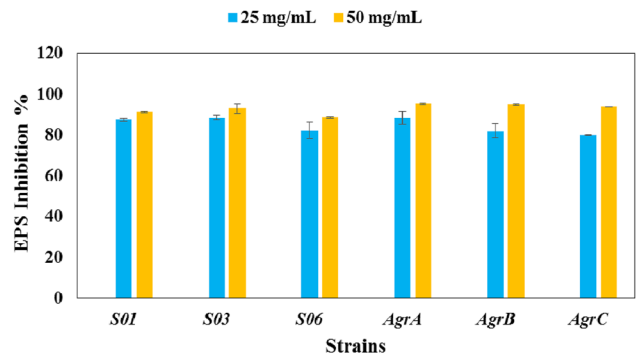


Figure 7: Effect of EgEO at (MIC50/2 and MIC/4) on EPS production in *Staphylococcus aureus*.

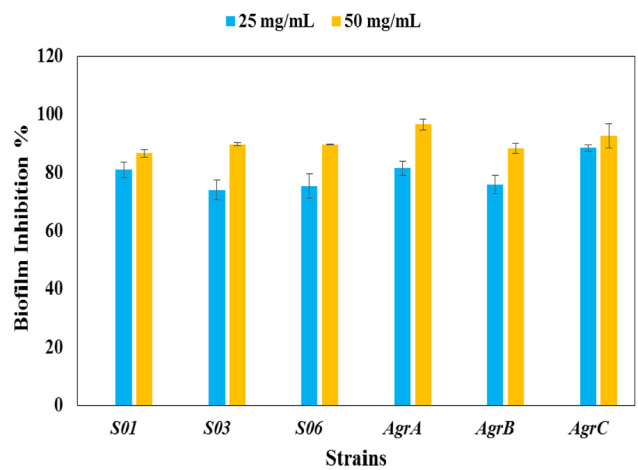


Figure 8: Anti-biofilm activity of EgEO (at MIC50/2 and MIC/4 concentration) on *Staphylococcus aureus* strains.

Table 4: Effect of EgEO (at MIC50/2 and MIC/4) on slime production in *Staphylococcus aureus*.

	S01	S03	S06	AgrA	AgrB	AgrC
25 mg/ml	-	-	-	-	-	-
50 mg/ml	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+

(-) Slime inhibition (negative production of black color around the colonies)

(+) Slime production (presence of black color around the colonies).

3.11 Light microscopy observation

The effect of EgEO (25 and 50 mg/mL) on surface adhesion was observed under light microscope. Results are

demonstrated in Figure 10. The presence of the EgEO reduced the biofilm formation in treated glass slides in on all the strains. While a strong biofilm formation were observed in the control glass slide.

3.12 ADMET Profile

The EgEO in Silico ADMET characteristics (14 identified compositions) were studied as it is demonstrated in Table 5 and Table 6. Furthermore, the selected compounds had an adequate Log Po/w varying between 2.60 and 4.60. Moreover, Lipinski's rule was confirmed and bioavailability scores (0.55) were described. In a liked manner, the identified compositions demonstrated excellent (TPSAs) values less

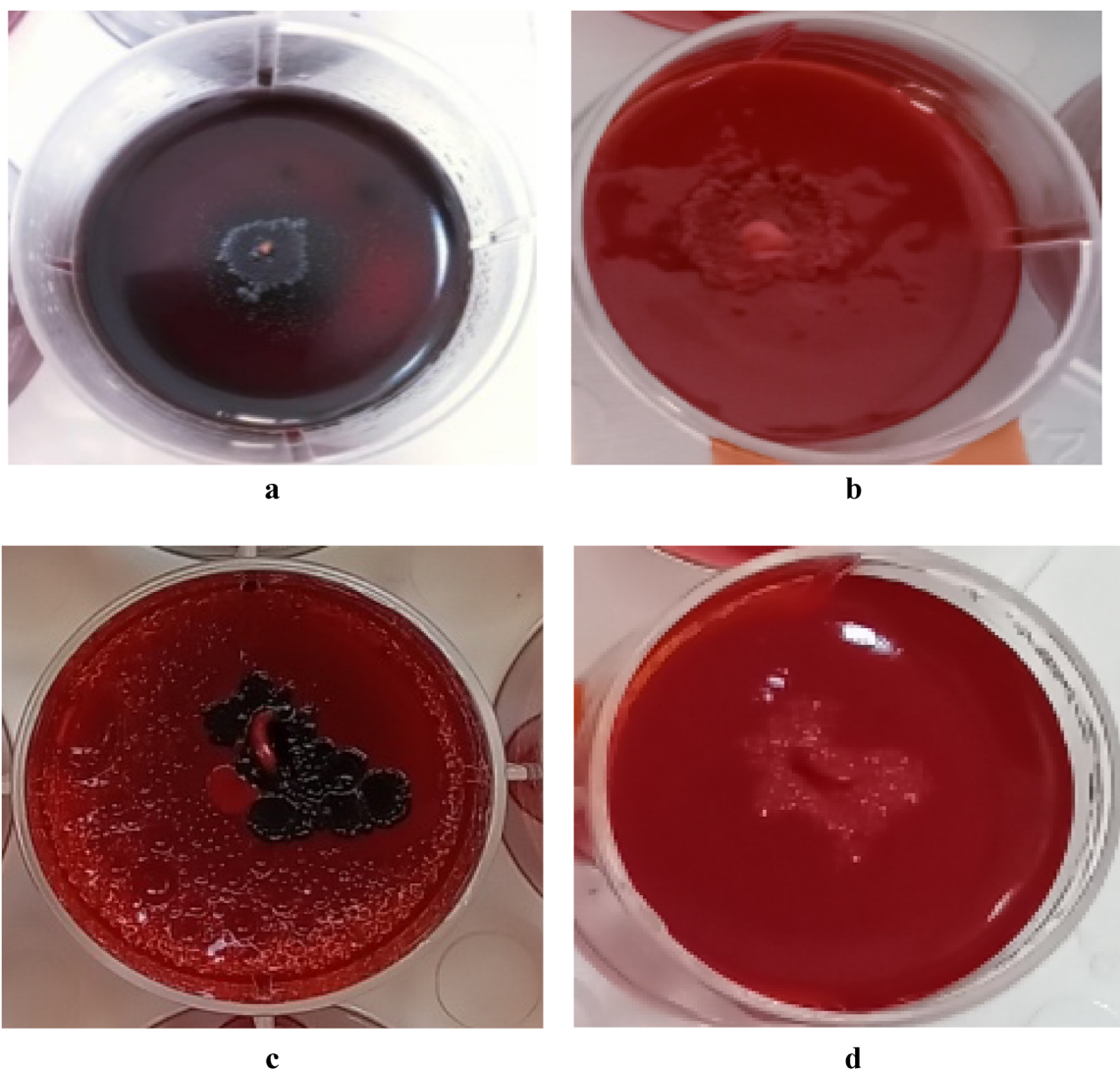


Figure 9: Effect of EgEO on slime production on Congo red agar. (a, b): Positive slime producer (occurrence of black color around the colonies), (c, d): negative slime producer (absence of black color).

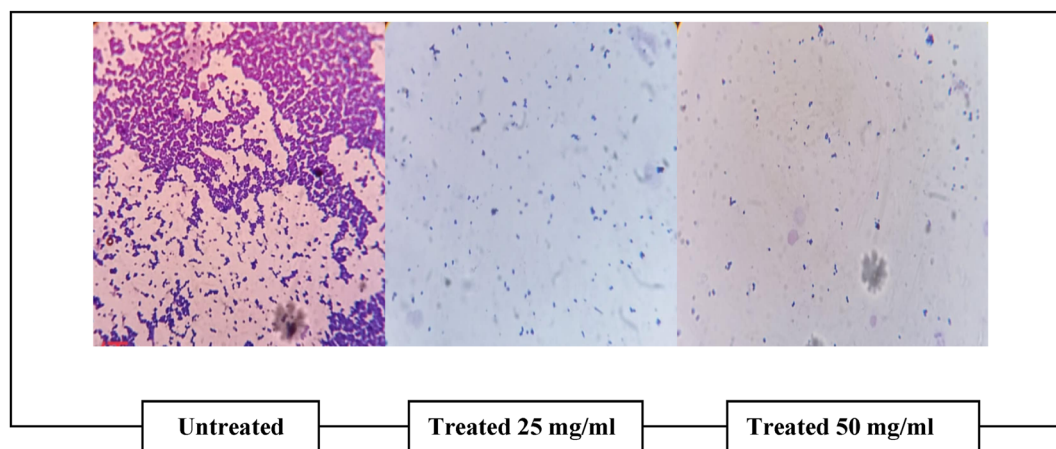


Figure 10: Inhibition of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by EGEO under light microscope (40 \times).

than 125 \AA^2 . These results revealed that the compositions are excluded to be orally absorbed. In contrast to the other compositions; 1, 8-Cinéole, 4-terpineol, 1(10),11-Eremophiladien-9-ol and Ylangenal indicates high gastro intestinal absorption.

The toxicity level of EgEO compounds was predicted using ProTox-II tool. In the present study, many facet of toxicity were taken into considering, including: Neurotoxicity, Ecotoxicity, BBB-Barrier, Cytochrome CYP2C9, Carcinogenicity, Cardiotoxicity, Respiratory Toxicity, Clinical Toxicity, Nutritional Toxicity, GABA Receptor, Estrogen Receptor Alpha and Pregnane X Receptor (Table 7.) For level toxicity classifications delineated were applied following: Class I is defined as being lethal if ingested, Class II as being fatal if swallowed, and Class VI as being non-toxic. These categories are based on the different levels of toxicity [43].

The radar plot (Figure 11) shows that all selected phytochemicals are inside and outside the pink zone, indicating their average similarity to a single drug and a good bioavailability profile. Moreover, pharmacokinetics were assessed using the boiled egg (Figure 12).

The majority of the molecules tested are situated in the white region of the HIA, indicating that are supposed to be absorbed in the intestines. The located of the molecules: Limonene, Alloaromadendrene, (+)-B-Cyclogermacrane, Germacrene B and 1(10),11-Eremophiladien-9- in the yellow region of the BBB, suggesting they may pass the blood-brain barrier.

3.13 Molecular docking

Molecular docking was performed on EgEO compounds, identified through GC-MS, against AgrA protein to confirm

their anti-quorum sensing activity. Therefore, the current study aims to determine the responsible molecules for this inhibition, and explore the manner of interaction of these molecules with the studied protein.

After the molecular docking analysis, we noticed that among all the derivatives, only four derivatives recorded good docking score values as shown in Table 7, this is why we detailed the mode of interaction of these hit molecules against the residues of active site of the AgrA enzyme (Figure 13). Compound 1(10),11-Eremophiladien-9-ol – is the most stable compound compared to the others, as it achieved better docking value (-5.630 kcal/mol), i.e., the lowest value. This stability can be attributed to the significant number of binding among this molecule and the enzyme's active site residues, as illustrated in Figure 14. Specifically, the compound formed six interactions in total: one hydrogen bond interaction between the GLU188 residue and the hydroxyl group (OH); two π -alkyl interactions with the PHE182 residue through the compound's carbon atoms; and three alkyl-alkyl interactions with the residues ILE143, LEU145, and LYS146.

The compound Ylangenal is highly stable in the active site, as it achieved a favorable docking score (-5.291 kcal/mol). This composition made a total of five interactions with the remains in the enzyme's cavity, as shown in Figure 15. These included: one H-bond interaction among the LYS146 residue and the oxygen atom of the aldehyde group (C=O), one carbon-hydrogen interaction with the GLU144 residue through the aldehyde carbon atom, and three alkyl-alkyl interactions with the residues ILE143, LEU192, and LYS146. The compound 4-Terpineol created a single H-bond with the GLU144 residue via the oxygen atom of its hydroxyl group (Figure 16). In opposite to, Eucalyptol formed two alkyl-alkyl interactions with the residues ILE143 and LYS146 (Figure 17). Molecular docking studies revealed that the stability of these

Table 5: Chosen ADMIE characteristics of EgEO molecules.

Entry	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Molecular weight (g/mol)	136.23 g/mol	136.23 g/mol	134.22 g/mol	136.23 g/mol	154.25 g/mol	136.23 g/mol	136.23 g/mol	136.23 g/mol	154.25 g/mol	204.35 g/mol	204.35 g/mol	220.35 g/mol	204.35 g/mol	218.33 g/mol
Num. heavy atoms	10	10	10	10	11	10	10	11	15	15	15	16	15	16
Num. arom. heavy atoms	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Friction Csp3	0.80	0.60	0.40	0.60	1.00	0.60	0.60	0.80	0.87	0.87	0.73	0.73	0.60	0.80
Num. rotatable bonds	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2
Num. H-bond acceptors	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
Num. H-bond donors	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Molar refractivity	45.22	47.12	45.99	47.12	47.12	47.12	47.12	48.80	67.14	67.14	68.78	69.94	70.68	67.34
TPSA	0.00 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	9.23 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	20.23 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	20.23 Å ²	0.00 Å ²	17.07 Å ²
Consensus log Po/w	3.44	3.35	3.54	3.37	2.67	3.35	3.40	2.60	4.34	4.34	4.12	3.49	4.60	3.40
Lipinski rules	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Bioavailability score	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
GI absorption	Low	Low	Low	Low	High	Low	Low	High	Low	Low	Low	High	Low	High
Bbb permeant	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes
p-gp substrate	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP1A2 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
CYP2D6 inhibitor	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Log Kp (cm/s)	-3.95 cm/s	-3.94 cm/s	-4.01 cm/s	-3.89 cm/s	-5.30 cm/s	-3.94 cm/s	-3.96 cm/s	-4.93 cm/s	-4.20 cm/s	-4.20 cm/s	-4.61 cm/s	-4.84 cm/s	-3.45 cm/s	-4.98 cm/s

Table 6: Toxicity study of EgEO compound.

Compound	LD ₅₀ (mg/kg)	Toxicity class	Predicted toxic effects
α-Pinene	3,700 mg/kg	5	Ecotoxicity (0.78); BBB-barrier (0.95); Neurotoxicity (0.51); Cytochrome CYP2C9 (0.69)
β-Pinene	4,700 mg/kg	5	Neurotoxicity (0.56); Ecotoxicity (0.72); BBB-barrier (0.96); Cytochrome CYP2C9 (0.66)
o-Cymene	1,370 mg/kg	4	Neurotoxicity (0.68); Carcinogenicity (0.64); Ecotoxicity (0.71); BBB-barrier (0.99); Cytochrome CYP2C9 (0.59)
Limonene	4,400 mg/kg	5	Neurotoxicity (0.6); Cardiotoxicity (0.72); BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.67); Cytochrome CYP2C9 (0.70)
Eucalyptol	2,480 mg/kg	5	BBB-barrier (0.98); Ecotoxicity (0.67)
γ-Terpinene	4,390 mg/kg	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.62); Estrogen Receptor Alpha (ER) (1.0)
Terpinolene	4,390 mg/kg	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.62); Estrogen Receptor Alpha (ER) (1.0); Cytochrome CYP2C9 (0.67)
4-Terpineol	1,016 mg/kg	4	BBB-barrier (0.89); Ecotoxicity (0.59); Cytochrome CYP2C9 (0.58)
Aromandendrene	5,000 mg/kg	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.67); Cytochrome CYP2C9 (0.63)
Alloaromadendrene	5,000 mg/kg	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.67); Cytochrome CYP2C9 (0.63)
(+)-B-Cyclogermacrene	5,300 mg/kg	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.68); Cytochrome CYP2C9 (0.61)
Germacrene B	4,390 mg/ml	5	BBB-barrier (0.97); Ecotoxicity (0.61); Cytochrome CYP2C9 (0.68)
1(10),11-Eremophiladien-9-ol	2,340 mg/kg	5	Neurotoxicity (0.65); Respiratory toxicity (0.79); BBB-barrier (0.95); Ecotoxicity (0.61); Clinical toxicity (0.51); Nutritional toxicity (0.61); GABA receptor (GABAR) (0.85); Cytochrome CYP2C9 (0.75)
Ylangenal	2,300 mg/kg	5	BBB-barrier (0.96); Ecotoxicity (0.70); GABA receptor (GABAR) (0.50); Pregnane X receptor (PXR) (0.50); Cytochrome CYP2C9 (0.62)

Table 7: Derivatives ranked after the study of docking.

Molecule	Complex binding free energy (kcal/mol)	Molecule	Complex binding free energy (kcal/mol)
1(10),11-Eremophiladien-9-ol	-5.630	Limonene	-3.225
Ylangenal	-5.291	Aromandendrene	-3.100
4-Terpineol	-5.080	Alloaromadendrene	-3.057
Eucalyptol	-4.520	B-cyclogermacrene	-3.186
α-Pinene	-3.899	Germacrene B	-2.852
β-Pinene	-3.360	γ-Terpinene	-2.520
o-Cymene	-3.390	Terpinolene	-2.101

molecules is ascribed to the existence of oxygen in their molecular structures, which creates high interactions, such as H-bonds, with the active site residues.

4 Discussion

Among the major issue facing the world is the rising of antimicrobial resistance phenomenon. Moreover, one of the factors contributing to this issue is the QS. Thus, the present

research aims to investigate the antimicrobial, antivirulence and anti-QS effect of EgEO against *S. aureus*. The *E. globulus* leaves presented liquid oil, yellowish in color and a pleasant odor. The results are similar to those described by these authors [44–47].

The extraction yield of *E. globulus* essential oil (EgEO) was 1.87 % (v/v), the results incorporate with those described by Rekioua et al. [48], in which he proposed a yield of 1.65 %. Contrary to our findings, Harkat-Madouri et al. [49] observed a higher yield (2.53 %). It should be noted that the disparity in yields within a specific category of species may be due to genetic, nature factors, the ingathering time and the manner of extraction [50].

The physicochemical profile was effective to determine the quality of EgEO which providing a density value of (0.910). The latter is between 0.905 and 0.921 according to the reference standard. Our results are close to that of Ben Hassine et al., [51], in which they described the value 0.920 as a relative density. Thus, our results are increased than those obtained by Belkhouja et al., [46] which are 0.632. In addition, the refractive index value obtained was 1.471. Our results are in agreement with the AFNOR standard which required that the refractive index value ranging from 1.460 to 1.476. The latter was lesser than those described by Mendes Silva et al., [52] and Kassahun et al., [53] that were 1.458 and 1.451 respectively for Eucalyptus

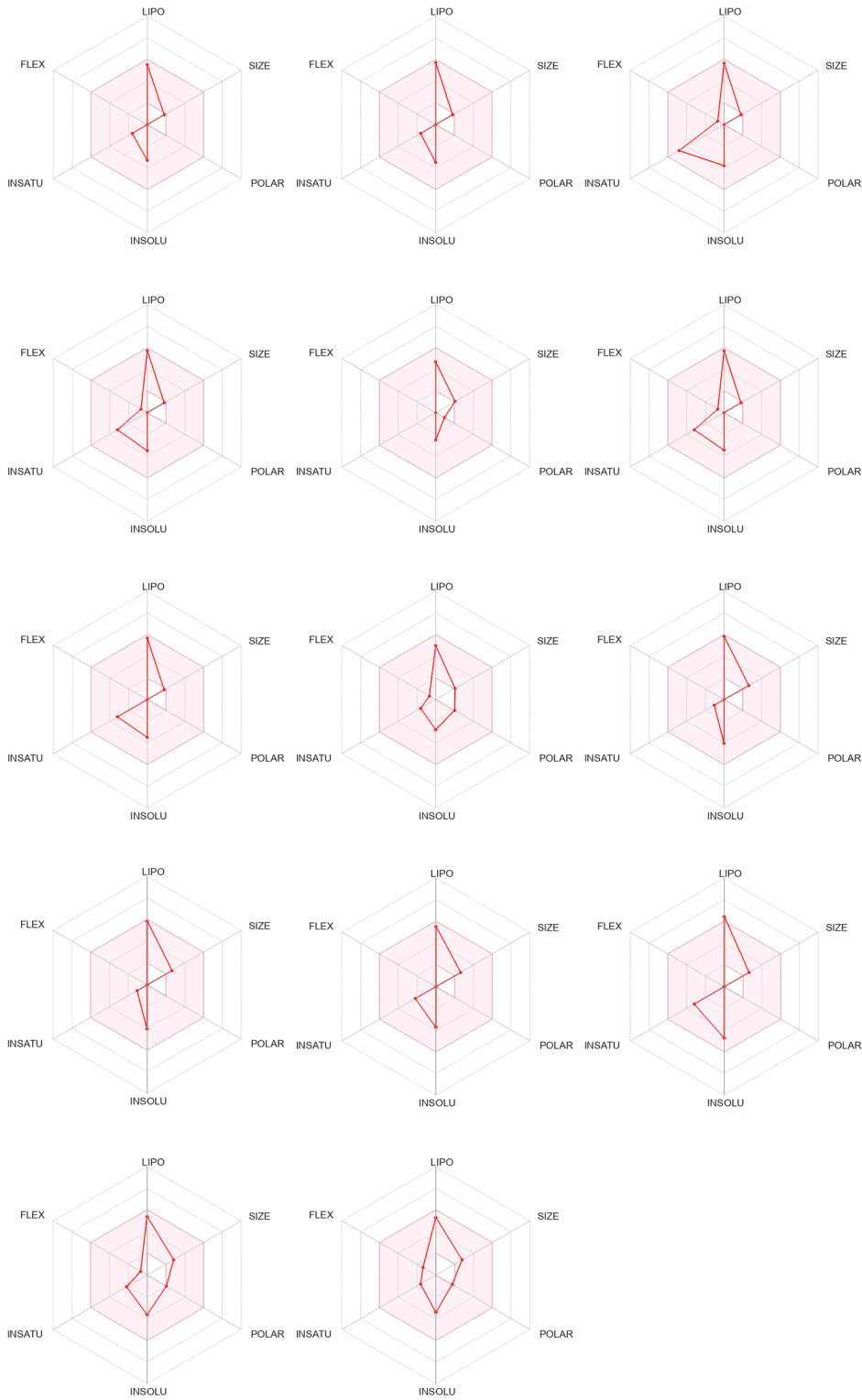


Figure 11: EgEO bioavailability polygons identified constituents dependent on their physicochemical parameters utilizing ADMET characteristics.

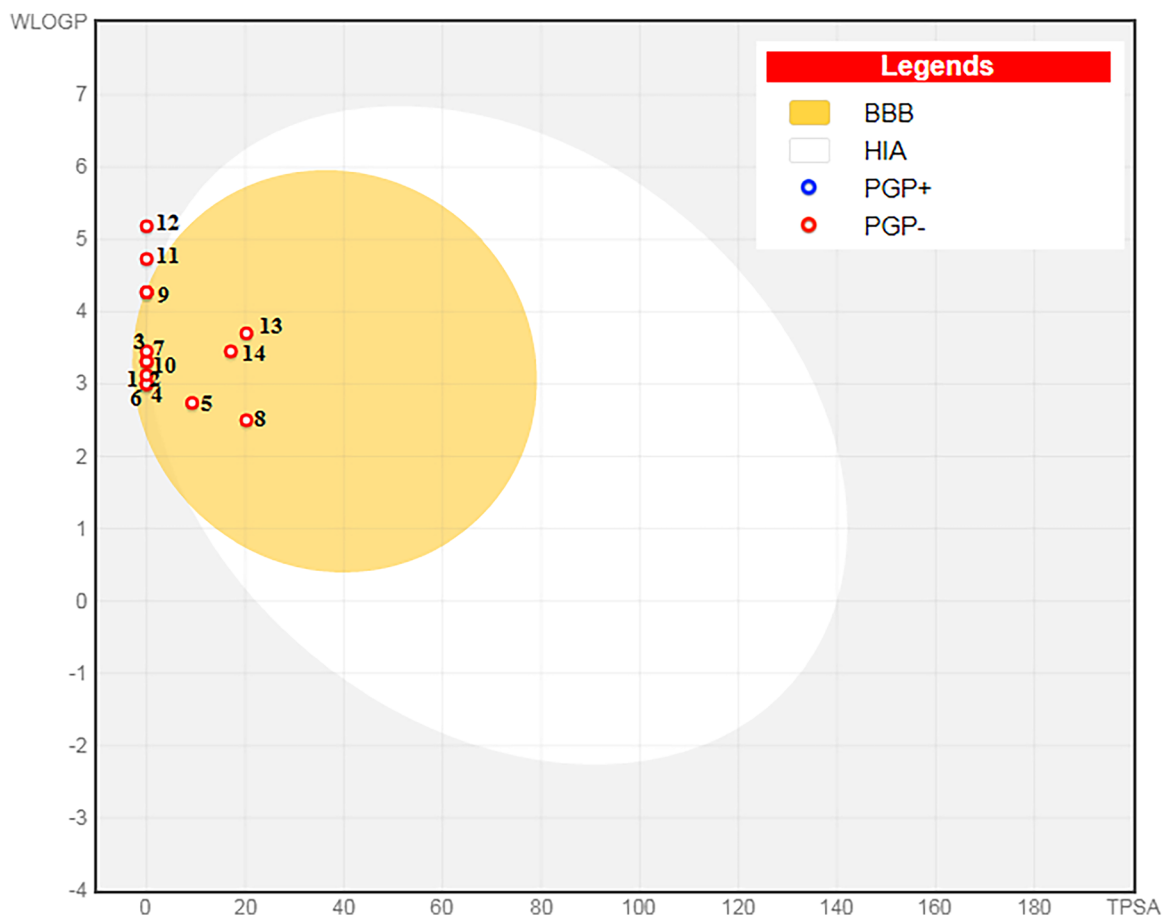


Figure 12: EgEO boiled-egg model identified compositions, which are listed in Table 1.

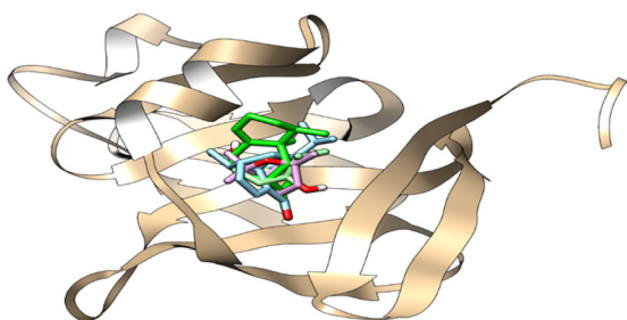


Figure 13: Superimposition of docked derivatives DNA-binding field of *Staphylococcus aureus* AgrA (PDB ID: 3BS1); compound (Ylangenal) (cyan), compound (4-Terpineol) (light green), compound (Eucalyptol) (pink), compound 1(10),11-Eremophiladien-9-ol.

Essential oils. Furthermore, the pH value is 4.9. This result is found in the standard reference that necessitated the range of (4–6). Our results are close to that of Belkhouja et al., [46] who obtained a pH of 4.5.

The effectiveness of FTIR in measuring functional groups and compounds in essential oils has been recognized in earlier findings [54, 55].

FTIR results revealed the presence of different compound that previously detected in EgEO like the major compound 1,8-cineole. Sharma et al., [56], showed consistent results, in which they revealed the existence of 1,8-cineole by FTIR analysis. In addition, El Orche et al., [57], reported 1,8-cineole as a major molecule in FTIR analysis of *E. globulus* oils isolated from different regions. The same findings were reported by Schulz et al., [58] and Dzimitrowicz et al., [59].

The EgEO GC/MS evaluation highlights 1,8-cineole (36.78 %) as the major compounds, accompanied by o-cymene (26.85 %), γ -terpinene (14.93 %), and α -pinene (7.78 %). Other compounds such as limonene (4.36 %) and minor constituents like β -Cyclogermacrene (3.42 %) and Germacrene B (1.30 %), were also identified. For instance, Daroui-Mokaddem et al., [60] reported higher eucalyptol content (48.6 %), which aligns closely with our findings.

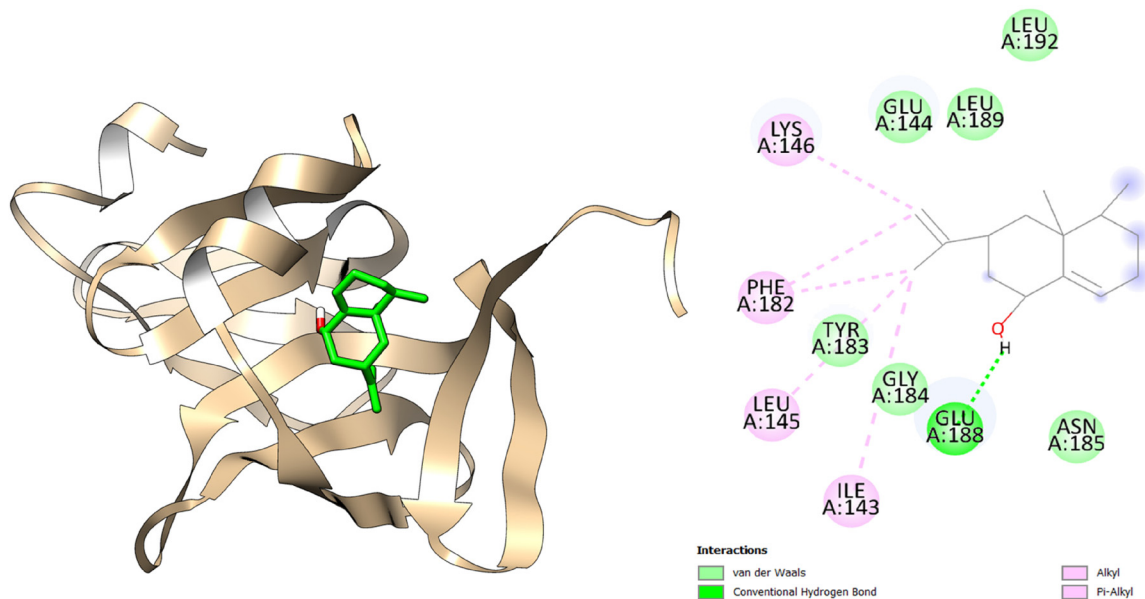


Figure 14: Docking pose of 1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a,5-dimethyl-3-(1-methylethenyl)- in DNA-binding domain of *Staphylococcus aureus* AgrA.

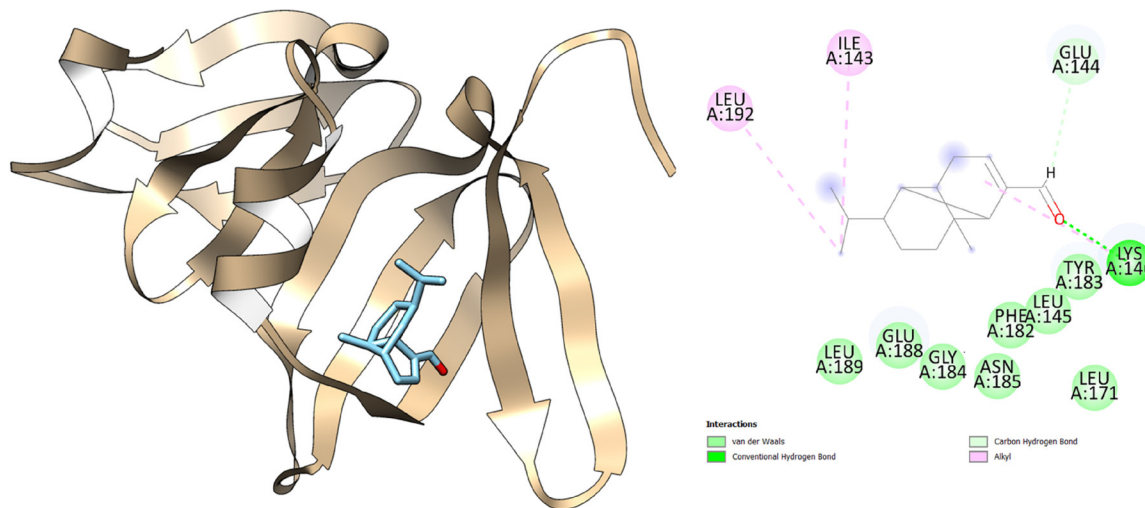


Figure 15: Docking pose of Ylangenal in DNA-binding domain of *Staphylococcus aureus* AgrA.

Similarly, Harkat-Madouri et al., [49] demonstrated a predominance of 1,8-cineole (55.29 %) and spathulenol (7.44 %), with γ -terpinene and α -pinene also detected in decreased concentrations. Moreover, Batista et al., [61] revealed 1,8-cineole as a main compound in EgEO with 87.21 %. Furthermore, Our findings is similar to previous ones of Atmani-Merabet et al., [45], in which they identified, 1,8-cineole (78.45 %), as major compounds in EgEO. Moreover, Sharafati Chaleshtori et al., [62] proved that 1,8-cineole (70.3 %) and Limonene (9.4 %) were identified in EgEO. Likewise, Ait Benlabchir et al., [63], highlighted eucalyptol as the main compound (62.32 %), with p-cymene (8.11 %) and

γ -terpinene (3.51 %) among the secondary constituents in EgEO. The proportions of eucalyptol and γ -terpinene in this finding are consistent with our research. Interestingly, the presence of o-cymene (25.42 %) among the major component in our study is closer to findings by Bourakna et al., [64], where o-cymene reached 28.30 %. Additionally, the elevated γ -terpinene content in our study is comparable to findings from Slovakian samples analyzed by Cmiková et al., [65] where γ -terpinene constituted 3.6 %. Nevertheless, Hafsa et al., [66] demonstrated a very low level of 1,8-cineole (3.16 %) in EgEO, that is in contradiction with our results. Among them, a research performed by Rekioua et al., [48]

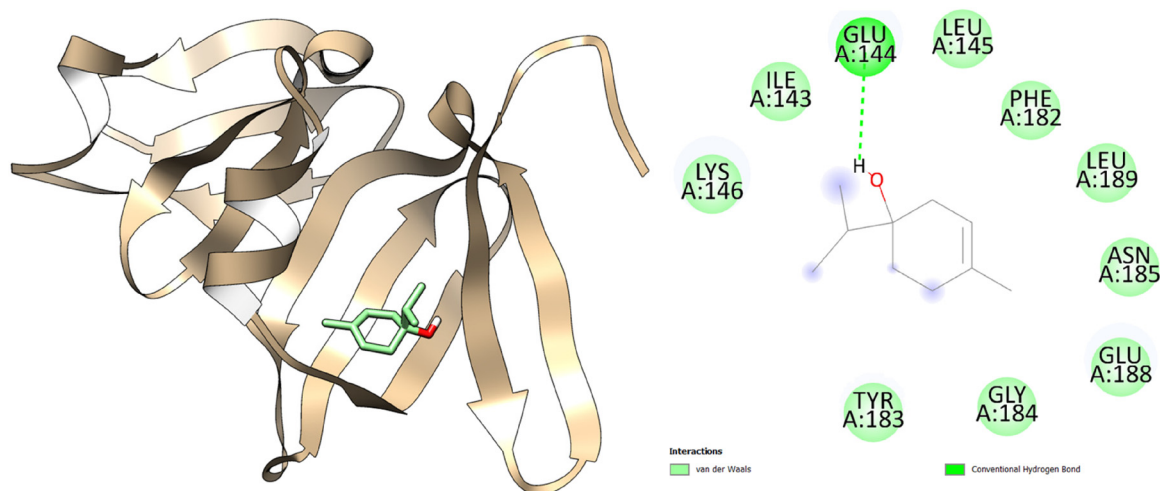


Figure 16: Docking pose of 4-Terpineol in DNA-binding domain of *Staphylococcus aureus* AgrA.

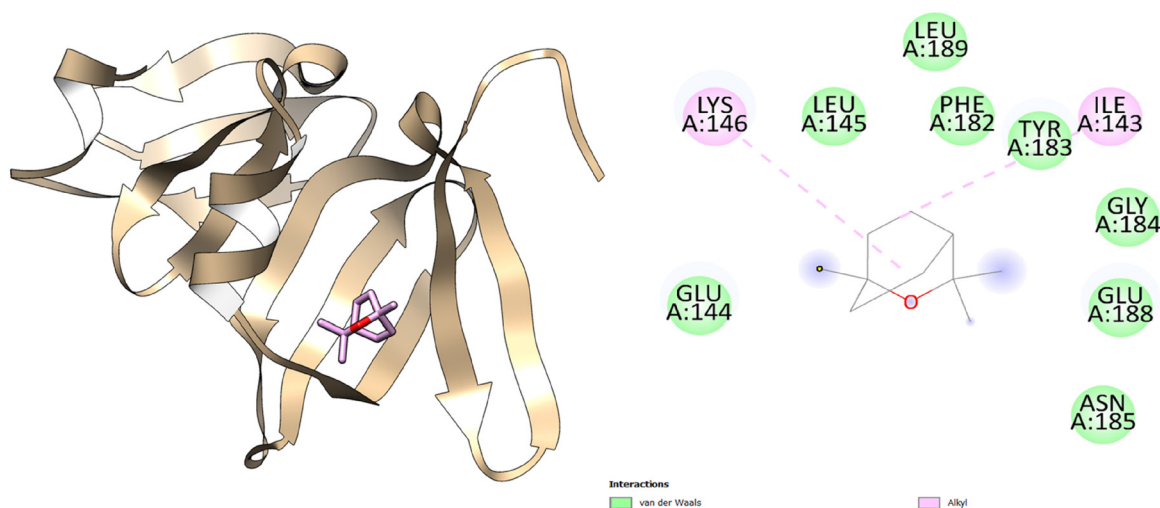


Figure 17: Docking pose of Eucalyptol in DNA-binding domain of *Staphylococcus aureus* AgrA.

demonstrated Aromandendrene (14.48 %) as major compounds after Ledol (12.24 %) and Eucalyptol (10.46 %). Overall, while our results align with many studies in terms of eucalyptol dominance, the higher levels of *o*-cymene and γ -terpinene observed in our sample distinguish it from other regional compositions. The variations in the chemical compounds of EgEO may be affected by local environmental or climatic conditions, extraction methods, plant maturity and the soil in diverse areas [67]. Previous studies, outlined eucalyptus as the main compounds in EgEO. 1,8-cineole has been thoroughly researched for its therapeutic characteristics, such as antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant effect [68–71].

The results revealed that EgEO exhibited variable antimicrobial activity, influenced by the essential oil concentration. The inhibition zone diameter varied from

(50.33 mm) to (13.00 mm). The highest inhibition area was identified for S01 in 200 mg/ml of concentration, in which a strong inhibition was noted at for all bacteria. Unlike the 12.5 mg/ml concentration, the inhibition diameters became smaller, which shows dose dependence. The AgrB bacteria is the most sensitive compared to AgrA and AgrC with inhibition diameters varied between (30.03; 25.63; 15.16 mm). Respectively, in corporation with these, Iseppi et al., [72] and Shah et al., [73] detected that the diameter of the inhibitory area was around 11–20 mm and 19 mm. El Guerrouj et al., [74] induced an inhibition zone of 20.4 mm of EgEO against *S. aureus*. Similarly, our results are also consistent with those of Bouras et al., [75] who reported a diameter zone from 8 to 14 mm, in which it indicates sensitivity for all the tested MRSA strains. Indeed, Farsi et al., [76] showed that the eucalyptus oil diameter of the inhibition zone was 10.83 and

11.33 mm. In contrary to our results, Chao et al., [77] detected the only study that produced no inhibition activity.

Salem et al., [78] reported ranging between 38 and 24 mm inhibition zones diameter between the antimicrobial oils, based on plant stage. These results may be due to the EO compositions isolated from EG. In addition, Merghni et al., [79] revealed 1,8-cineole as an effective component, unlike the EO with diameter zone inhibition ≥ 29 mm and 10.7 mm to 26.3 mm respectively.

The synergistic outcomes between the first and second components of eucalyptus essential oil enhance its antimicrobial activity and not only the single component [80]. The eucalyptus essential oil antimicrobial effect pathway incorporate the disruption of enzymes and bacterial protein, the transformation of cell membrane transport capacity in bacteria [81]. For instance, the EgEO components, including β -pinene, 1,8-cineole, limonene, α -pinene and citronellol, are toxic to many microbes [82, 83]. In addition, 1,8-cineole, is a significant aromatic plants component, containing in various medicinal plants, possesses several features such as antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, and anti-fungal activities [84, 85]. Moreover, the EgEO antimicrobial action involves of the alteration of bacterial protein function, the deactivation of bacterial enzymes, membrane modification infusibility of Gram-negative bacteria in addition to the binding of cationic ions located in the cytoplasm bacteria [81].

QS is a crucial and essential process in bacteria. The N-acylhomoserine lactones (AHLs) autoinducers considered as commonly preserved signal molecules in Gram negative bacteria quorum sensing system [86]. Moreover, this system effectively manages virulence factors, whereas antibiotic treatment makes the natural environment more severe, since the bacteria increases drug resistance, as a result, it survives by biofilm formation [87].

Therefore, the use of QS inhibitors substances, bioactive compounds or synthetic considered as an efficient strategy to block QS controlled gene expression [88].

The anti-QS effect activity was conducted using two methods: the detection of QS on agar medium as well as the measurement of violacein from *C. violaceum* CECT 494 cultures with EgEO at different concentrations. The obtained results showed that EgEO has an anti-QS effect, in the sub-MIC 25 and 50 mg/mL, with a diameter of (14.1 mm) and (18.46 mm). Respectively, these findings aligned with those of Luís et al., [89], in which they mentioned the anti-QS effect of EgEO against *C. violaceum* with a diameter of 10 mm. Similarly, Merghni et al., [79] observed that EgEO presented a greater anti-QS activity than that of 1,8-cineole with an inhibition diameter of violacein three times larger. The same conclusion was noted by [90, 91]. Earlier research has

mentioned that the violacein pigment can be inhibited by bioactive compound without affecting the *C. violaceum* growth [92, 93].

Typically, bacterial communication depends on QS signaling compounds including N-acylhomoserine lactones (AHLs), since this phenomenon plays an important role in microbial virulence. Many scientists are trying to develop natural products that can disrupt QS. Limiting this virulence process leads to the attenuation of microbial virulence, as well as the treatment of several infections [94]. The results demonstrated that the EgEO significantly inhibited violacein synthesis by (56.09 %) and (83.11 %) ($p < 0.01$) in CECT 494. These results are consistent with the studies of (Luís., 2016) [89], that showed the capacity of EgEO to block violacein biosynthesis of *C. violaceum*. Yet, the study described by Ceballos et al., [95] demonstrated the decreased of violacein by 13.2 %. In addition, Karuppiah et al., [96], found that 1,8-cineole inhibited significantly the violacein secretion.

EPS act a key role in isolating and shielding cells from external damage and stress and It protect the cells and prevents any molecules from entering the matrix. Thus, the cells become more resistant to antibiotics [97]. In addition, EPS comprises proteins, nucleic acids and carbohydrates, which facilitate the anchoring of the cell to the substrate [98]. In this data, the production of EPS was substantially affected by EgEO. In the same way, the essential oil of *Melaleuca alternifolia* and its separated molecule terpinene-4-ol inhibited the biofilm formation in MRSA bacteria [99].

Bacterial biofilms are a serious global health problem, as these unique niches protect bacteria not only from harsh conditions but also from toxic components such as antibiotics that enter the bacterial biofilm community, increasing bacterial resistance leading to the establishment of MDR bacteria [100]. Hence, for the purpose of studying the antiviral and anti-biofilm effect of EgEO, the MIC and sub-MIC were identified. At 100 mg/ml, the MIC was set for all the studied bacteria. For instance, El Guerrouj et al., [74], noted that essential oils showed varying minimum inhibitory concentrations (MIC) (8 mg/ml and 16 mg/ml) against the *S. aureus* bacteria. Moreover, Our findings are aligned with the results of Merghni et al., [79], that showed that EgEO and its main compound inhibited biofilm formation with decrease percentage varying between (74.74 %) to (90.81 %). Furthermore, Hendry et al. [101] revealed that EgEO is efficient against biofilm and planktonic growth states. Similarly, Punitha et al., [102] and Vieira et al., [103] mentioned that biofilm was significantly reduced by eucalyptus oil.

The ability of EO to reduce *S. aureus* slime production bacteria was demonstrated utilizing the CRA test. *E. globulus* essential oil reduced slime synthesis in all strains tested, which was detected by a color change from black to

burgundy red. AgrA (accessory gene regulator A) is an essential protein in the (QS) regulation mechanism of *S. aureus* bacteria. This system permits the bacteria to cooperate gene expression according to cell density. It performs a vital role in virulence and resistance to hostile environments. Consequently, inhibiting AgrA blocks the virulence elements expression (toxins, hemolysins, enzymes), thus, it prevents the bacteria from being capable of causing severe infections [104].

5 Conclusions

In this research, *E. globulus* essential oil was chemically evaluated and tested for antimicrobial, anti-virulence and QSI activity against *S. aureus* strains. FT-IR and GC-MS profiling of the oil revealed that the *E. globulus* EO is rich on chemical molecules, where 1,8-cineole is considered as the principal compound. The EgEO showed a crucial effect on biofilm and virulence factors in *S. aureus*. Hence, this result is a promising approach to advance pharmacological agent against *S. aureus* diseases.

Acknowledgments: The authors extend their appreciation to Taif University, Saudi Arabia, for supporting this work through project number (TU-DSPP-2024-10).

Funding information: This research was funded by Taif University, Saudi Arabia, Project No. (TU-DSPP-2024-10).

Conflicts of interest: There are no conflicts to declare.

Author contributions: Conception or design: ST, DB, AI, PT, KM, RE, RS, SHA, AB, FA, RHK, AMA, AA Acquisition, analysis, or interpretation of data: AI, PT, KM, RE, RS Drafting the work or revising: ST, DB, SHA, AB, FA, RHK, Final approval of the manuscript: PT, KM, RE, RS, SHA, AB, FA, RHK, AMA, AA.

Ethical approval: Ethical approval was not required for this study.

Data availability statement: The datasets that support the findings of this study are openly available in request from corresponding author.

References

- Pejić M, Stojanović-Radić Z, Genčić M, Dimitrijević M, Radulović N. Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food Chem Toxicol* 2020;141:111431.
- Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, et al. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases. *Toxins* 2022;14:464.
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:603–61.
- Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JY, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol* 2023;21:380–95.
- Collins J, Rudkin J, Recker M, Pozzi C, O’Gara JP, Massey RC. Offsetting virulence and antibiotic resistance costs by MRSA. *ISME J* 2010;4:577–84.
- Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:12.
- Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:529–43.
- Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:435–47.
- Alenazi NA, Aleanizy FS, Alqahtani FY, Aldossari AA, Alanazi MM, Alfaraaj R. Anti-quorum sensing activity of poly-amidoamine dendrimer generation 5 dendrimer loaded kinase inhibitor peptide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi Pharm J* 2024;32:101932.
- Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in *Staphylococci* – an overview. *Front Microbiol* 2015;6:1174.
- Alfaraaj R, Eltayb EK, Alfayez BM, Abohamad A, Eltahir E, Alenazi NA, et al. Studying the anti-virulence activity of meta-bromo-thiolactone against *Staphylococcus aureus* and MRSA phenotypes. *Microbiol Res* 2023;14:1596–609.
- Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:27–33.
- Kiran MD, Adikesavan NV, Cirioni O, Giacometti A, Silvestri C, Scalise G, et al. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol Pharmacol* 2008;73:1578–86.
- Bakari S, Ncir M, Felhi S, Hajlaoui H, Saoudi M, Gharsallah N, et al. Chemical composition and in vitro evaluation of total phenolic, flavonoid, and antioxidant properties of essential oil and solvent extract from the aerial parts of *Teucrium polium* grown in Tunisia. *Food Sci Biotechnol* 2015;24:1943–9.
- Daoud A, Ben Mefteh F, Mnafigui K, Turki M, Jmal S, Ben Amar R, et al. Cardiopreventive effect of ethanolic extract of date palm pollen against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats through the inhibition of the angiotensin-converting enzyme. *Exp Toxicol Pathol* 2017;69:656–65.
- Spadaccino G, Frabboni L, Petrucci F, Disciglio G, Mentana A, Nardiello D, et al. Essential oil characterization of *Prunus spinosa* L., *Salvia officinalis* L., *Eucalyptus globulus* L., *Melissa officinalis* L. and *Mentha x piperita* L. by a volatilomic approach. *J Pharm Biomed Anal* 2021;202:114167.
- Shala AY, Gururani MA. Phytochemical properties and diverse beneficial roles of *Eucalyptus globulus* Labill: a review. *Horticulturae* 2021;7:450.
- Asif M, Saleem M, Saadullah M, Yaseen HS, Al Zazour R. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. *Inflammopharmacology* 2020;28:1153–61.
- Chandorkar N, Tambe S, Amin P, Madankar C. A systematic and comprehensive review on current understanding of the

- pharmacological actions, molecular mechanisms, and clinical implications of the genus *Eucalyptus*. *Phytomed Plus* 2021;1:100089.
20. Boukraâ D, Kiari FZ, Kerdal L, Rguieg F. Drying methods affect the extracts and essential oil of *Mentha aquatica* L. *Food Biosci* 2021;41:101007.
 21. Haj Moussa H, Benamara S, Benhalima H, Benaliouche F, Sbartaï I, Sbartaï H. Chemical characterization of *Eucalyptus globulus* leaf essential oil and evaluation of its antifungal, antibacterial and antioxidant activities. *Cell Mol Biol* 2025;70:1–9.
 22. AFNOR. Collection of standards: essential oils. Volume 2. Monographs relating to essential oils. Paris: AFNOR; 2000:661–3 pp.
 23. Agatonovic-Kustrin S, Ristivojevic P, Gegechkori V, Litvinova TM, Morton DW. Essential oil quality and purity evaluation via FT-IR spectroscopy and pattern recognition techniques. *Appl Sci* 2020;10:7294.
 24. Erenler R, Pabuccu K, Yagliglu AS, Demirtas I, Gul F. Chemical constituents and antiproliferative effects of cultured *Mougeotia nummuloides* and *Spirulina major* against cancerous cell lines. *Z Naturforsch C* 2016;71:87–92.
 25. Amini R, Abdulmir AS, Ling BP, Jahanshiri F, Hematian A, Zargar M, et al. Isolation and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from keys of college students using different detection methods. *Br Biotechnol J* 2011;2:13–25.
 26. Socohou A, Sina H, Degbey C, Adjobimey T, Sossou E, Boya B, et al. Pathogenicity and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the hospital environment of CHU-Z Abomey-Calavi/Sô-Ava (Benin). *BioMed Res Int* 2021;2021:6637617.
 27. Noumi E, Snoussi M, Hadjlaoui H, Valentin E, Bakhrout A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:81–8.
 28. Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol* 2004;91:105–8.
 29. Truchado P, Gil A, Tomas-Barberán FA, Allende A. Inhibition by chestnut honey of N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009;57:11186–93.
 30. Viszwapiya D, Subramenium GA, Prithika U, Balamurugan K, Pandian SK. Betulin inhibits virulence and biofilm of *Streptococcus pyogenes* by suppressing *ropB* core regulon, *sagA* and *dltA*. *Pathog Dis* 2016;74:ftw088.
 31. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;28:449–61.
 32. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42:872–4.
 33. Lakshmi SA, Bhaskar JP, Krishnan V, Sethupathy S, Pandipriya S, Aruni W, et al. Inhibition of biofilm and biofilm-associated virulence factor production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by docosanol. *J Biotechnol* 2020;317:59–69.
 34. Kadri A, Aouadi K. In vitro antimicrobial and α -glucosidase inhibitory potential of enantiopure cycloalkylglycine derivatives: insights into their in silico pharmacokinetic, druglikeness, and medicinal chemistry properties. *J Appl Pharm Sci* 2020;10:107–15.
 35. Othman IM, Gad-Elkareem MA, Snoussi M, Aouadi K, Kadri A. Novel fused pyridine derivatives containing pyrimidine moiety as prospective tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: design, synthesis, pharmacokinetics and molecular docking studies. *J Mol Struct* 2020;1219:128651.
 36. Sidote DJ, Barbieri C, Wu T, Stock AM. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with a novel mode of binding. *Structure* 2008;16:727–35.
 37. Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des* 2013;27:221–34.
 38. Schrödinger. LigPrep, Version 3.4. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2015.
 39. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 2004;47:1739–49.
 40. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 2006;49:6177–96.
 41. Dekir A, Berredjem M, Benzaid C, Djouad SE, Iqbal N, Laichi Y, et al. Novel N-acylsulfonamides: synthesis, in silico prediction, molecular docking dynamic simulation, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *J Biomol Struct Dyn* 2023;41:9232–44.
 42. Dekir A, Berredjem M, Rachedi KO, Bahadi R, Djouad SE, Bouacida S, et al. X-ray crystallographic study, molecular docking, molecular dynamics and DFT/ADMET analyses of carboxylsulfamides. *J Mol Struct* 2023;1289:135831.
 43. Mehta J, Utkarsh K, Fuloria S, Singh T, Sekar M, Salaria D, et al. Antibacterial potential of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and its bioactive molecules against uropathogens – an in silico study to identify potential lead molecule(s) for the development of new drugs to treat urinary tract infections. *Molecules* 2022;27:4971.
 44. Boukhatem MN, Amine FM, Kameli A, Saidi F, Walid K, Mohamed SB. Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) origin. *Int Lett Chem Phys Astron* 2014;17:303–15.
 45. Atmani-Merabet G, Belkhiri A, Dems MA, Lalaouna A, Khalfaoui Z, Mosbah B. Chemical composition, toxicity, and acaricidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil from Algeria. *Curr Issues Pharm Med Sci* 2018;31:89–93.
 46. Belkhdja H, Bouhadi D, Medjadel B, Brakna A. Physicochemical characterization and evaluation of the antioxidant activities of essential oil extracted from *Eucalyptus globulus*. *Eur J Biol Res* 2021;11:315–24.
 47. Zonfrillo M, Andreola F, Krasnowska EK, Sferrazza G, Pierimarchi P, Serafino A. Essential oil from *Eucalyptus globulus* (Labill.) activates complement receptor-mediated phagocytosis and stimulates podosome formation in human monocyte-derived macrophages. *Molecules* 2022;27:3488.
 48. Rekioua N, Boumendjel M, Taïbi F, Samar MF, Jemaa JMB, Benaliouche F, et al. Insecticidal effect of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* essential oils on a stored food pest *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Cell Mol Biol* 2022;68:144–57.
 49. Harkat-Madouri L, Asma B, Madani K, Said ZBOS, Rigou P, Grenier D, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Ind Crops Prod* 2015;78:148–53.
 50. Bruneton J. Pharmacognosie – phytochimie, plantes médicinales, 2nd ed. Paris: Tec et Doc, Éditions Médicales Internationales; 2008:1188 p.

51. Ben Hassine D, Abderrabba M, Yvon Y, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, et al. Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules* 2012;17:9540–58.
52. Mendes Silva S, Abe SY, Murakami FS, Frensch G, Francisco AM, Nakashima T. Essential oils from different plant parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a source of 1,8-cineole and their bioactivities. *Pharmaceuticals* 2011;4:1535–50.
53. Kassahun A, Feleke G. Chemical composition and physico-chemical analysis of *Eucalyptus globulus* leaves and oil. *Sci J Chem* 2019;7:36–8.
54. Bounaas K, Bouzidi N, Daghbouche Y, Garrigues S, de la Guardia M, El Hattab M. Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy. *Microchem J* 2018;139:347–56.
55. Raeber J, Steuer C. Exploring new dimensions: single and multi-block analysis of essential oils using DBDI-MS and FT-IR for enhanced authenticity control. *Anal Chim Acta* 2023;1277:341657.
56. Sharma AD, Sharma R, Duhan P, Duhan A. Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. *Drug Anal Res* 2021;5:26–38.
57. El OA, El Mrabet A, Said AAH, Mousannif S, Elhamdaoui O, Ansari SA, et al. Integration of FTIR spectroscopy, volatile compound profiling, and chemometric techniques for advanced geographical and varietal analysis of Moroccan *Eucalyptus* essential oils. *Sensors* 2024; 24:7337.
58. Schulz H, Ozkan G, Baranska M, Kruger H, Ozcan G. Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2005;39:249–56.
59. Dzimitrowicz A, Jamroz P, Babinska M, Gawel-Beben K, Rafińska K, Szwajgier D, et al. Comparison of the characteristics of gold nanoparticles synthesized using aqueous plant extracts and natural plant essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. *Arab J Chem* 2019;12:4795–805.
60. Daroui-Mokaddem H, Kabouche A, Bouacha M, Soumati B, El-Azzouny A, Bruneau C, et al. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil of fresh leaves of *Eucalyptus globulus*, and leaves and stems of *Smyrniolus olusatrum* from Constantine (Algeria). *Nat Prod Commun* 2010;5:1934578X1000501031.
61. Batista DG, Sganzerla WG, da Silva LR, Vieira YGS, Almeida AR, Domingui D, et al. Antimicrobial and cytotoxic potential of *Eucalyptus* essential oil-based nanoemulsions for mouthwashes application. *Antibiotics* 2024;13:942.
62. Sharafati Chaleshtori F, Saholi M, Sharafati Chaleshtori R. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Bunium persicum*, *Eucalyptus globulus*, and rose water on multidrug-resistant *Listeria* species. *J Evid Based Integr Med* 2018;23: 2515690X17751314.
63. Ait Benlabchir A, Fikri-Benbrahim K, Moutawalli A, Alanazi MM, Halmoune A, Benkhoulil FZ, et al. GC-MS characterization and bioactivity study of *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) essential oils and their fractions: antibacterial and antioxidant properties and molecular docking modeling. *Pharmaceuticals* 2024;17:1552.
64. Bourakna Z, Righi K, Righi FA. GC/MS analysis of *Eucalyptus globulus* L. (Myrtaceae) leaves essential oil from Algeria and their insecticidal activity against adults of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera; Tephritidae). *J Essent Oil Bear Plants* 2022;25:876–87.
65. Cmíková N, Galovičová L, Schwarzová M, Vukić MD, Vuković NL, Kowalczewski PŁ, et al. Chemical composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* essential oil. *Plants* 2023;12:1076.
66. Hafsa J, Smach MA, Khedher MRB, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H, et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT – Food Sci Technol* 2016;68:356–64.
67. Ni ZJ, Wang X, Shen Y, Thakur K, Han J, Zhang JG, et al. Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends Food Sci Technol* 2021;110: 78–89.
68. Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia* species. *Z Naturforsch C* 2006; 61:347–50.
69. Van Vuuren SF, Viljoen AM. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr J* 2007;22:540–4.
70. Vilela GR, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFGF, et al. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *J Stored Prod Res* 2009;45:108–11.
71. Cai J, Yang D, Zhang J, Guo J, Jiang L. Evaluation of bio-guided fraction from *Laminaria japonica* as a natural food preservative based on antimicrobial activity. *Food Meas Charact* 2020;14:3061–8.
72. Iseppi R, Mariani M, Condo C, Sabia C, Messi P. Essential oils: a natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics* 2021;10:417.
73. Shah SN, Khan I, Tul Muntaha S, Hayat A, Ur Rehman M, Shah TA, et al. Bioactive, antioxidant and antimicrobial properties of chemically fingerprinted essential oils extracted from *Eucalyptus globulus*: In-vitro and in-silico investigations. *Front Chem* 2023;11:1287317.
74. El GB, Taibi M, Elbouzidi A, Bouhassoun S, Loukili EH, Moubchir T, et al. The effect of altitude on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils. *Trop J Nat Prod Res* 2023;7:5279–85.
75. Bouras M, Abbaci NB, Bennadja S. Antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 2016;8:1717–21.
76. Farsi R, Alaidaroos B. Antibacterial activity of *Eucalyptus* essential oil loaded on silica dioxide nanoparticles (SiNPs) against some pathogenic bacteria. *Int J Pharm Pharmacol Res* 2022;12:29–37.
77. Chao S, Young G, Oberg C, Nakaoka K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour Fragr J* 2008;23:444–9.
78. Salem N, Kefi S, Tabben O, Ayed A, Jallouli S, Feres N, et al. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence of synergism with antimicrobial standards. *Ind Crops Prod* 2018;124:115–25.
79. Merghni A, Noumi E, Hadded O, Dridi N, Panwar H, Ceylan O, et al. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog* 2018;118:74–80.
80. Rosso A, Lollo G, Chevalier Y, Troung N, Bordes C, Bourgeois S, et al. Development and structural characterization of a novel nanoemulsion for oral drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2020;593: 124614.
81. Noronha CM, De Carvalho SM, Lino RC, Barreto PLM. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chem* 2014;159:529–35.

82. Souto EB, Cano A, Martins-Gomes C, Coutinho TE, Zielińska A, Silva AM. Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. *Bioengineering* 2022;9:158.
83. Nunes MR, Da Rosa CG, De Borba JR, Dos Santos GM, Ferreira AL, Barreto PLM. Zein nanoparticles: bioactive compounds and controlled delivery. In: Jana S, Jana S, editors. *Nanoengineering of Biomaterials*. Wiley; 2022:411–36 pp.
84. Miranda I, Lima L, Quilho T, Knapic S, Pereira H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. *Ind Crops Prod* 2016;82:81–7.
85. Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *J Sci Food Agric* 2018;98:833–48.
86. Dong Y, Gusti AR, Zhang Q, Xu J, Zhang L. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1754–9.
87. Chan K, Atkinson S, Mathee K, Sam C, Chhabra SR, Camara M, et al. Characterization of N-acylhomoserine lactone degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol* 2011;11:51.
88. Morohoshi T, Tokita K, Ito S, Saito Y, Maeda S, Kato N, et al. Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *J Biosci Bioeng* 2012;116:175–9. Advance online publication.
89. Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crops Prod* 2016;79:274–82.
90. Borges A, Serra S, Cristina Abreu A, Saavedra MJ, Salgado A, Simões M. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. *Biofouling* 2014;30:183–95.
91. Sagar PK, Sharma P, Singh R. Inhibition of quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation by *Eucalyptus globulus* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pharmacopuncture* 2022;25:37–45.
92. Zhu H, He CC, Chu QH. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Lett Appl Microbiol* 2011;52:269–74.
93. Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3:954–9.
94. Asfour HZ. Anti-quorum sensing natural compounds. *J Med Antimicrob Agents* 2018;6:1–10.
95. Cervantes-Ceballos L, Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J. Repellent and anti-quorum sensing activity of six aromatic plants occurring in Colombia. *Nat Prod Commun* 2015;10:1934578X1501001030. Article 1934578X1501001030.
96. Karuppiah V, Thirunanasambandham R, Thangaraj G. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of 1,8-cineole derived from *Musa paradisiaca* against *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *World J Microbiol Biotechnol* 2021;37:66. Article 12.
97. Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. *Front Immunol* 2014;5:37.
98. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33.
99. Noumi E, Merghni A, Alreshidi M, Haddad O, Akmadar G, De Martino L, et al. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: models for evaluating anti-quorum sensing activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol. *Molecules* 2018;23:2672.
100. Sharma AD, Farmaha M, Kaur I, Singh N. Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. *Drug Anal Res* 2021;5:26–38.
101. Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1219–25.
102. Punitha TB, Kannayan M, Ponnusamy V, Rajasamy V, Selvam S, Murugesan B, et al. In vitro antibacterial activity of essential plant oils against biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian J Pharm Clin Res* 2014;7:220–5.
103. Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira AP, Mendes Â, et al. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem Biodivers* 2017;14:e1700006.
104. Ganesh PS, Veena K, Senthil R, Iswamy K, Ponmalar EM, Mariappan V, et al. Biofilm-associated Agr and Sar quorum sensing systems of *Staphylococcus aureus* are inhibited by 3-hydroxybenzoic acid derived from *Illicium verum*. *ACS Omega* 2022;7:14653–65.