



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz- Fès
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"



Formation Doctorale :RNE2D

Spécialité : Gestion et Valorisation des Bioressources

**Laboratoire : Laboratoire d'Ingénierie, d'Electrochimie, de
Modélisation et d'Environnement**

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

O U E D R H I R I w e s s a l

Optimisation des Propriétés antibactériennes et antioxydantes des l'huiles essentielles de dix plantes aromatiques et médicinales de la région de Taounat, exploitation des outils statistiques (Plans d'expériences).

Soutenue le 16 /09/ 2017 devant le jury composé de :

Pr. Taleb Mustapha	FSDM- Fès	Président
Pr. ZAID Abdelhamid	Faculté des Sciences-Meknès	Rapporteur
Pr. ES-SAFI Nour-Eddine	ENS-Rabat	Rapporteur
Pr. ABDELLAOUI Abdelfattah	FSDM -Fès	Rapporteur
Pr. ELGHADRAOUI Lahsen	FST- Fès	Examineur
Pr. GUEMOUH Rajae	FSDM - Fès	Examineur
Pr. GRECHE Hassane	FST Fès	Directeur de thèse

Dédicaces

A la mémoire de mon père

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de Faculté des sciences dhar-mahraz, et du Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales et Substances Naturelles (LPAMSN), Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA), sous la direction du Pr. Hassane Greche.

En sa qualité de Directeur de thèse, je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance au Pr. Hassane Greche., Professeur Habilité à la FST, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour sa qualité d'encadrement pour mener à bien le sujet de recherche qu'il m'a confié, pour sa disponibilité, ses orientations et ses conseils. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je remercie également Pr. El Hassouni Mohammed, Directeur du Centre d'Etudes Doctorales (CED).

J'aimerais adresser un remerciement particulier au Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, le Pr. Mohammed BENLEMLIH.

Ce travail aurait été incomplet sans la mise en place de collaborations essentielles, permettant notamment d'approfondir cette étude.

Pour cela, je remercie Mme sandrine MOJA, Professeur à université de JEAN-MONNET de saint etienne, ainsi que son équipe.

Je remercie également le Professeurs TALEB Mustapha, Professeur de l'enseignement supérieur de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz Fès, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette soutenance.

Je tiens à remercier les Professeurs ZAID Abdelhamid, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences Meknès, et ES-SAFI Nour-Eddine Professeur de l'enseignement supérieur à l'école nationale supérieure de Rabat, et ABDELLAOUI Abdelfattah Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz Fès, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie le Professeur ELGHADRAOUI Lahsen, Professeur de l'enseignement supérieur à

la Faculté des Sciences et Techniques Fès, et GUEMOUH Rajae, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz Fès, d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs et toutes les personnes qui par leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Je n'aurais pas pu mener cette thèse jusqu'au bout sans le soutien de ceux qui me sont les plus proches. J'adresse donc mes derniers remerciements à ma famille.

A toutes et à tous, UN GRAND MERCI

Liste des tableaux

Tableau 1 Interactions antimicrobiennes des combinaisons des HEs, et de leurs composés, contre plusieurs micro-organismes.....	19
Tableau 2 : Indice de CIF adopté par différents auteurs.....	22
Tableau 3: Présentation générale d'un tableau d'analyse de la variance adapté pour une régression multiple.....	37
Tableau 4: Plantes étudiées, origines, parties utilisées et périodes de récolte.....	41
Tableau 5: Rendements en HE des plantes étudiées.....	43
Tableau 6: Composition chimique de l'HE d' <i>O. compactum</i>	44
Tableau 7: Composition chimique de l'HE d' <i>O. majorana</i>	46
Tableau 8: Composition chimique de l'HE du <i>T. serpyllum</i>	47
Tableau 9: Composition chimique de l'HE de <i>L. dentata</i>	49
Tableau 10: La composition chimique de l'HE d' <i>A. herba-alba</i>	51
Tableau 11: Composition chimique de l'HE de <i>M. communis</i>	52
Tableau 12: Composition chimique de l'HE de <i>M. spicata</i>	54
Tableau 13 Composition chimique de l'HE de <i>P. asperum</i>	56
Tableau 14: Composition chimique de l'HE d' <i>O. mixta</i>	58
Tableau 15: Composition chimique de l'HE des feuilles du <i>C. aurantium</i>	60
Tableau 16: Zones d'inhibition des HEs étudiées.....	67
Tableau 17: les CMI des HEs étudiées.....	69
Tableau 18: les CMB des HEs étudiées	70
Tableau 19: Caractère bactéricide ou bactériostatique des HEs.....	70
Tableau 20 : k et k' des différentes combinaisons réalisées	74
Tableau 21: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>T. serpyllum</i> contre <i>B. subtilis</i>	74
Tableau 22: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>T. serpyllum</i> contre <i>S. aureus</i>	75
Tableau 23: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>T. serpyllum</i> contre <i>E. coli</i>	75
Tableau 24: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>T. serpyllum</i> contre <i>P. aeruginosa</i>	76
Tableau 25: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>L. dentata</i> contre <i>B. subtilis</i>	76
Tableau 26 : Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>L. dentata</i> contre <i>S. aureus</i>	77
Tableau 27: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. majorana</i> et de <i>L. dentata</i> contre <i>E. coli</i>	77
Tableau 28: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d' <i>O. mixta</i> et de <i>P. asperum</i> contre <i>B. subtilis</i>	78
Tableau 29: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison d'HE d' <i>O. mixta</i> et de <i>P. asperum</i> contre <i>S. aureus</i>	78
Tableau 30: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE des feuilles et celle du zeste de <i>C. aurantium</i> contre <i>B. subtilis</i>	79
Tableau 31: Teneur en HEs dans les différentes expériences	84

Tableau 32: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange1 contre B subtili	86
Tableau 33: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche <i>B. subtilis</i>	88
Tableau 34: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche <i>S. aureus</i>	88
Tableau 35: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche <i>E. coli</i>	89
Tableau 36: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées par le mélange 1 contre <i>B. subtilis, S. aureus et E. coli</i>	90
Tableau 37 : Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre <i>B. subtilis</i>	91
Tableau 38: Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre <i>S. aureus</i>	91
Tableau 39: Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre <i>E. coli</i>	92
Tableau 40: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 2.....	99
Tableau 41: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre <i>B. subtilis</i>	101
Tableau 42: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre <i>S. aureus</i>	102
Tableau 43: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre <i>E. coli</i>	102
Tableau 44: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre <i>P. aeruginosa</i>	103
Tableau 45: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées pour le mélange 2 contre <i>B. subtilis, S. aureus, E. coli et P. aeruginosa</i>	104
Tableau 46: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour <i>B. subtilis</i>	105
Tableau 47: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour <i>S. aureus</i>	105
Tableau 48: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour <i>E. coli</i>	106
Tableau 49: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour <i>P. aeruginosa</i>	106
Tableau 50: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange3.....	115
Tableau 51: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre <i>B. subtilis</i>	116
Tableau 52: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre <i>S. aureus</i>	117
Tableau 53: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre <i>E. coli</i>	117
Tableau 54: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées pour le mélange 3.....	118
Tableau 55: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche <i>B. subtilis</i>	119
Tableau 56: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche <i>S. aureus</i>	119
Tableau 57: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche <i>E. coli</i>	120
Tableau 58: Teneur des mélanges en HEs étudiées.....	131
Tableau 59: IC50 obtenues pour les HEs	133
Tableau 60: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales obtenues par le mélange 1	133
Tableau 61: Analyse de la variance pour le modèle postulé par le mélange 1	134

Tableau 62: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par le modèle du mélange 1	135
Tableau 63: Effets des coefficients du modèle du mélange 1 qui relie la réponse aux facteurs	135
Tableau 64: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 2.....	138
Tableau 65: Analyse de la variance pour le modèle postulé du mélange 2.....	138
Tableau 66: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculé par le modèle du mélange2	139
Tableau 67: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs	140
Tableau 68: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 3.....	142
Tableau 69: Analyse de la variance pour le modèle postulé du mélange 3.....	143
Tableau 70: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculé par le modèle du mélange 3	144
Tableau 71: Effets des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs	144

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse d'isoprène : La voie du mévalonate.....	7
Figure 2 Biosynthèse d'isoprène : La voie du MEP	8
Figure 3 : Biosynthèse générale des terpénoïdes[1]	9
Figure 4: Terpènes antibactériens.....	15
Figure 5: Domaine expérimental continu	29
Figure 6 Domaine expérimental discret	29
Figure 7: Schéma illustre Le mélange 1 qui contient 20 % de A et 80 % de B. Le mélange 2 contient 77 % de A et 23 % de B [101].....	31
Figure 8: Compositions des mélanges à deux constituants représentées par les points du segment de droite AB [101].....	32
Figure 9: Représentation des mélanges à trois constituants à l'aide d'un triangle équilatéral[101]	32
Figure 10 : Etapes mathématiques aboutissant au calcul des coefficients[103]	35
Figure 11: Dégradation d'acétate de sabinène pendant l'hydrodistillation.....	45
Figure 12: Schéma descriptif de la méthode de diffusion sur disc d'agar	64
Figure 13: Schéma descriptif de la méthode déterminant la CMI	65
Figure 14: Schéma descriptif de la méthode déterminant le CIF indice	73
Figure 15 : Expériences à réalisées dans un plan de mélange centré augmenté.....	84
Figure 16: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche <i>B. subtilis</i>	87
Figure 17: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche <i>S. aureus</i>	87
Figure 18: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche <i>E. coli</i>	87
Figure 19: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche <i>B. subtilis</i>	88
Figure 20: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche <i>S. aureus</i>	89
Figure 21: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche <i>E. coli</i>	90
Figure 22: Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange 1	93
Figure 23: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre <i>B. subtilis</i>	95
Figure 24: Profileur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de <i>B. subtilis</i>	95
Figure 25: Profileur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de <i>S. aureus</i>	96
Figure 26: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre <i>S. aureus</i>	97
Figure 27: Profileur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de <i>E. coli</i>	98
Figure 28: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre <i>E. coli</i>	98
Figure 29: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche <i>B. subtilis</i>	100
Figure 30: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche <i>S. aureus</i>	100

Figure 31: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche <i>E. coli</i>	100
Figure 32: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche <i>P. aeruginosa</i>	101
Figure 33 : Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2 correspondant à la souche <i>B. subtilis</i>	101
Figure 34: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche <i>S. aureus</i>	102
Figure 35: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche <i>E. coli</i>	103
Figure 36: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche <i>P. aeruginosa</i>	103
Figure 37 : Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange	108
Figure 38: Profileur du mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 pour la souche <i>B. subtilis</i>	110
Figure 39: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis <i>B. subtilis</i>	110
Figure 40: Profileur de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de <i>S. aureus</i>	111
Figure 41: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis <i>S. aureus</i>	111
Figure 42: Profileur de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de <i>E. coli</i>	112
Figure 43: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis <i>E. coli</i>	113
Figure 44: Profileur de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de <i>P. aeruginosa</i>	113
Figure 45: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i>	114
Figure 46: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche <i>B. subtilis</i>	114
Figure 47: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche <i>S. aureus</i>	115
Figure 48: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche <i>E. coli</i>	116
Figure 49: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 3 correspondant à la souche <i>B. subtilis</i>	116
Figure 50: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 3 correspondant à la souche <i>S. aureus</i>	117
Figure 51: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 3 correspondant à la souche <i>E. coli</i>	118
Figure 52: Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange 3	121
Figure 53: Profileur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche <i>B. subtilis</i>	123
Figure 54: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis <i>B. subtilis</i>	123
Figure 55: Profileur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche <i>S. aureus</i>	124
Figure 56: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis <i>S. aureus</i>	124
Figure 57: Profileur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche <i>E. coli</i>	125

Figure 58: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis <i>E. coli</i>	125
Figure 59: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 1	134
Figure 60 : Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 1	136
Figure 61: Profileur du mélange 1 pour AA=78%	137
Figure 62: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 1	137
Figure 63: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 2	139
Figure 64: Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 2	140
Figure 65: Profileur de mélange 2 pour AA=78%	141
Figure 66: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 2	142
Figure 67: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 3	143
Figure 68: Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 3	145
Figure 69: Profileur de mélange 3 pour AA=70%	146
Figure 70: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 3	146
Figure 71: Chromatogramme de l'HE d' <i>O. compactum</i>	179
Figure 72: Chromatogramme de l'HE d' <i>O. majorana</i>	180
Figure 73: Chromatogramme de l'HE de <i>T. serpyllum</i>	181
Figure 74: Chromatogramme de l'HE de <i>L. dentata</i>	182
Figure 75: Chromatogramme de l'HE de <i>M. spicata</i>	183
Figure 76: Chromatogramme de l'HE de <i>M. communis</i>	184
Figure 77: Chromatogramme de l'HE d' <i>A. herba-alba</i>	185
Figure 78: Chromatogramme de l'HE d' <i>O. mixta</i>	186
Figure 79: Chromatogramme de l'HE de <i>P. asperum</i>	187
Figure 80: Chromatogramme de l'HE de <i>C. aurantium</i> feuilles	188
Figure 81: Chromatogramme de l'HE de <i>C. aurantium</i> Zest	189
Figure 82: Structures des composés majoritaires des HEs étudiées	190

Liste des abréviations

β_{ij} : Coefficient des termes du modèle

AA : Absorbance antioxydante

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de la variance

b : Vecteur de tous les coefficients du modèle

\hat{b} : Vecteur de tous les coefficients déterminés avec l'hypothèse des moindres carrés

BHA : Butylhydroxyanisol hydroxyanisol butylé

BHT : Butylhydroxyanisol hydroxytoluène butylé

CIF : Concentration inhibitrice fractionnaire

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ddl : Nombre de degrés de liberté

DEV : Distillation par entraînement à la vapeur

DIC: Instantaneous Controlled Pressure Drop

DPPH: 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

DTD: désorption thermique directe

FRAP: ferric reducing ability of plasma

GC/MS : chromatographie gazeuse/ spectrométrie de masse

HE : huile essentielle

MDA : Malondialdéhyde

PAM : Plantes aromatiques et médicinales

PE : Plan d'expériences

p-value : Probabilité de significativité

r : Résidu

RLM : Régression linéaire multiple

SCE : Sommes des carrés des écarts

SCM : somme des carrés due à la moyenne

SCRC : somme des carrés des réponses calculées

SCRCm : Somme des carrés des réponses calculées corrigée de la moyenne

SCRM : Somme des carrés des réponses mesurées

SCRMm : Somme des carrés des réponses mesurées corrigée à la moyenne

TRAP : Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter

UFC : Unité formant colonie

X_i : Facteur

Y : Réponse

\hat{Y} : Réponse estimée par le modèle

Table de matière

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VII
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES	5
1. DEFINITION :	5
2. TAXONOMIE DES PLANTES PRODUISANT LES HUILES ESSENTIELLES	5
3. LOCALISATIONS DES HE	5
4. COMPOSITION CHIMIQUE ET BIOSYNTHESE DES HE	6
4.1. Classification.....	6
4.2. Biosynthèse d'isoprène	6
4.2.1. La voie du mévalonate	6
4.2.2. La voie du MEP	7
4.3. Biosynthèse de terpénoïdes.....	8
II. PARAMETRES INFLUENÇANT LE PROFIL CHIMIQUE DES HE DES PLANTES AROMATIQUES	9
III. TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES	10
IV. PROCEDES D'EXTRACTION DES HE	11
1. METHODES CONVENTIONNELLES :	11
1.1. Extraction par entraînement à la vapeur	11
1.2. Expression à froid :	12
2. Autres méthodes innovantes	12
2.1. La technique de désorption thermique directe :	12
2.2. Extraction par sonication	12
2.3. Extraction assistée par micro-onde.....	12
2.4. Extraction assistée par champ électrique pulsé.....	12
2.5. Extraction par pression instantanée contrôlée.....	13
2.6. Extraction par fluide supercritique (ESF).....	13
2.7. Distillation destructive	13
3. Etude comparative des méthodes d'extraction des HE	13
V. POUVOIR ANTIBACTERIEN DES HES.....	14
1. L'activité antibactérienne des HEs et leurs composés	14
2. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien des HES	16
2.1. Méthodes de diffusion	16
2.2. Méthodes de dilution	17
2.3. Effet antibactérien combinatoire des HE	18
2.4. Interactions entre les HE et entre leurs composés	18

2.5. Méthodes d'évaluation du pouvoir antimicrobien combinatoire.....	21
VI. POUVOIR ANTIOXYDANT DES HES	23
1. Effet oxydant/antioxydant	23
2. Activité antioxydante des HE et leurs composés	24
3. Méthodes d'évaluation d'activité antioxydante	25
3.1. Mesure des radicaux libres.....	25
3.2. β -carotène	25
3.3. Test de FRAP	25
3.4. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique.....	25
3.5. Mesure d'hexanal et des produits finis liés	26
3.6. TRAP (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter)	26
3.7. Le test de stabilité accélérée	26
3.8. Dosage de Phycoerythrin.....	26
VII. PLANS D'EXPERIENCE.....	26
1. INTRODUCTION.....	26
2. NOTIONS ET TERMINOLOGIE	27
2.1. Expérience	27
2.2. Facteurs et réponses	27
2.3. Domaine de variation d'un facteur et Espace expérimentale.....	28
2.4. Domaine expérimental réel ou domaine d'étude	28
2.5. Domaine continu	28
2.6. Domaine discret	29
2.7. Interaction.....	29
2.8. Degrés de liberté d'un modèle.....	29
2.9. Résidus	30
2.10. Fonction de désirabilité.....	30
2.11. Notion de modélisation mathématique	30
2.12. Plan de mélange	31
2.12.1. Contrainte fondamentale des mélanges.....	31
2.12.2. Représentation géométrique des mélanges	31
2.12.2.1. Mélange à deux	31
2.12.2.2. Mélange à trois.....	32
2.12.2.3. Modèles mathématiques des mélanges	33
2.12.2.4. Analyse globale des résultats	34
VIII. LES PLANTES ETUDIEES :	37
1. <i>ORIGANUM MAJORANA</i> :.....	37
2. <i>ORIGANUM COMPACTUM</i>	38
3. <i>THYMUS SERPYLLUM</i>	38
4. <i>MENTHA SPICATA</i>	38
5. <i>MYRTUS COMMUNIS</i>	38
6. <i>ARTEMISIA HERBA-ALBA</i>	38
7. <i>CITRUS AURANTIUM</i>	39
8. <i>LAVENDULA DENTATA</i>	39
9. <i>PELARGONIUM ASPERUM</i>	39

PARTIE II : CONTRIBUTION A LA VALORISATION DES PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES
MAROCAINES..... 40

CHAPITRE I : EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES, RENDEMENTS, ET COMPOSITIONS CHIMIQUES
..... 41

I- INTRODUCTION.....	41
II- MATERIEL ET METHODES :	41
1. Matériel végétale	41
2. Extraction des huiles essentielles et calcul des rendements	42
3. Détermination de la composition chimique : Chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.....	42
III- RESULTATS ET DISCUSSION : RENDEMENT ET COMPOSITIONS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	43
1. <i>Origanum compactum</i>	43
2. <i>Origanum majorana</i>	44
3. <i>Thymus serpyllum</i>	46
4. <i>Lavandula dentata</i>	48
5. <i>Artemisia herba-alba</i>	50
6. <i>Myrtus communis</i>	51
7. <i>Mentha spicata</i>	53
8. <i>Pelargonium asperum</i>	55
9. <i>Ormenis mixta</i>	57
10. <i>Citrus aurantium</i> (Feuilles).....	59
11. <i>Citrus aurantium</i> Zest	61
IV- CONCLUSION	61

CHAPITRE II : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE : CRIBLAGE, DETERMINATION DE LA CMI ET DE LA CMB
..... 62

I. INTRODUCTION	62
II. MATERIEL ET METHODES :	62
1. SOUCHES MICROBIENNES CIBLES.....	62
2. CONSERVATION DES SOUCHES	63
3. MILIEUX DE CULTURE.....	63
4. PREPARATION DES BACTERIES (CULTURE FRAICHE)	63
5. PREPARATION DE LA SOLUTION BASO4 (0,5 MCFARLAND).	63
6. PREPARATION D'INOCULUM.....	63
7. DIFFUSION SUR DISQUE D'AGAR.....	64
8. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.....	64
9. CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE	65
III. RESULTATS ET DISCUSSION :	65
1. DIFFUSION SUR DISQUE D'AGAR - CRIBLAGE ANTIBACTERIEN	65
2. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.....	67
3. CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE	69

IV- CONCLUSION :	70
-------------------------------	-----------

CHAPITRE III : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE : MELANGE BINAIRE **72**

I. INTRODUCTION	72
II. MATERIEL ET METHODES :	72
1. METHODE DE DAMIER (CHACKERBOARD).....	72
2. COMBINAISONS BINAIRES	73
III. RESULTATS ET DISCUSSION :	74
1. Mélange binaire 1 : <i>Origanum majorana/Thymus serpyllum</i>	74
2. Mélange binaire 2 : <i>Origanum majorana/ Lavandula dentata</i>	76
3. Mélange binaire 3 : <i>Pelargonium asperum/Ormenis mixta</i>	78
4. Mélange binaire 4 : <i>Citrus aurantium Feuilles/Citrus aurantium Zest</i>	79
5. Discussion générale des mélanges binaires :	79
IV. CONCLUSION :	81

CHAPITRE IV : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE : MELANGE TERNAIRE (PLAN DE MELANGE)..... **83**

I. INTRODUCTION	83
II. MATERIEL ET METHODES :	83
1. ETABLISSEMENT DES EXPERIENCES.....	83
2. PREPARATION DES MELANGES :	85
3. LES CMI DES MELANGES	85
4. ETUDES STATISTIQUES.....	85
III. RESULTATS ET DISCUSSION :	86
1. MELANGE 1 : <i>ORIGANUM COMPACTUM/ORIGANUM MAJORANA/THYMUS SERPYLLUM</i>	86
1.1. Réponses	86
1.2. Validation statistique du modèle postulé	87
1.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	87
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	88
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	89
1.3. Etude statistique des résidus	90
1.4. Estimations des coefficients.....	91
1.4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	91
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	91
1.4.3. <i>Escherichia coli</i>	91
1.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D	92
1.6. Point-Test	94
1.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité	94
1.7.1. <i>Bacillus subtilis</i>	94
1.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	95
1.7.3. <i>Escherichia coli</i>	97
1.8. Optimisation de formulation multiple	98
2. Mélange 2: <i>Origanum majorana/Thymus serpyllum/Mentha spicata</i>	99

2.1. Réponses	99
2.2. Validation statistique du modèle postulé	101
2.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	101
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	102
2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	102
2.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
2.3. Etude statistique des résidus	104
2.4. Estimations des coefficients.....	104
2.4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	104
2.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	105
2.4.3. <i>Escherichia coli</i>	105
2.4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	106
2.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D	106
2.6. Point-Test	109
2.7. Optimisation de la formulation	109
2.7.1. <i>Bacillus subtilis</i>	109
2.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	110
2.7.3. <i>Escherichia coli</i>	112
2.7.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	113
2.8. Optimisation multiple	114
3. Mélange 3 : <i>Myrtus communis</i> / <i>Artemisia herba-alba</i> / <i>Thymus serpyllum</i>	114
3.1. Réponses	114
3.2. Validation statistique du modèle postulé	116
3.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	116
3.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	117
3.2.3. <i>Escherichia coli</i>	117
3.3. Etude statistique des résidus	118
3.4. Estimations des coefficients.....	118
3.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D	120
3.6. Point-Test	122
3.7. Optimisation de la formulation	122
3.7.1. <i>Bacillus subtilis</i>	122
3.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	124
3.7.3. <i>Escherichia coli</i>	125
3.8. Optimisation de formulation multiple	126
4. DISCUSSION DES MELANGES TERNAIRES : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	126
IV- CONCLUSION	129

CHAPITRE V : ACTIVITE ANTIOXYDANTE **130**

I. INTRODUCTION	130
II. MATERIEL ET METHODES :.....	130
1. CRIBLAGE :DPPH	130
2. MELANGE TERNAIRE : DPPH	131
III. RESULTATS ET DISCUSSION :	131

1. CRIBLAGE : DPPH.....	131
2. Mélange ternaire.....	133
2.1. Mélange1 : <i>Origanum compactum/Origanum majorana/Thymus serpyllum</i>	133
2.1.1. Réponses expérimentales	133
2.1.2. Validation statistique.....	134
2.1.3. Etude des résidus	134
2.1.4. Estimation des coefficients	135
2.1.5. Modèle mathématique et représentation 3D.....	136
2.1.6. Point-Test	136
2.1.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité.....	136
2.2. Mélange 2 : <i>Origanum majorana/Thymus serpyllum/ Mentha spicata</i>	138
2.2.1. Réponses	138
2.2.2. Validation statistique.....	138
2.2.3. Etude des résidus	139
2.2.4. Estimation des coefficients	139
2.2.5. Modèle mathématique et représentation 3D.....	140
2.2.6. Point-test.....	141
2.2.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité.....	141
2.3. Mélange 3 : <i>Myrtus communis/ Artemisia herba-alba/ Thymus serpyllum</i>	142
2.3.1. Réponses	142
2.3.2. Validation statistique.....	143
2.3.3. Etude des résidus	143
2.3.4. Estimation des coefficient.....	144
2.3.5. Modèle mathématique retenus et représentation 3D	145
2.3.6. Point-test.....	145
2.3.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité.....	146
2.4. Discussion des mélanges ternaires : activité antioxydante.....	147
IV. CONCLUSION	148
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>149</u>
<u>REFERENCES.....</u>	<u>151</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>179</u>

Introduction générale

L'utilisation des huiles essentielles HEs a évolué à travers les époques entre l'exploitation à l'état brut des plantes, l'extraction comme substances odorantes (macération, infusion)..., jusqu'à l'identification de leurs compositions, leurs effets biologiques, chimiques, et biochimiques.

Les applications des HE dans la thérapie pendant la révolution industrielle ont pris une autre dimension, en constituant une ère d'or pour les PAM. Notamment, l'étude des propriétés antimicrobiennes des HE qui fût repris par Chamberland en 1887 et suivi par le terme « aromathérapie » établi en 1928 par René-Maurice Gattefossé. Ce dernier a publié en 1931 son 1^{er} ouvrage décrivant les relations structure/activités des composants aromatiques et a codifié les grandes propriétés des arômes naturels : antitoxique, antiseptique, calmante, stimulante, tonifiante. Ainsi, l'intégration du terme chémotype par P. Franchomme vers les années 70, a permis d'approfondir les travaux scientifiques et de mieux concevoir les différents effets des HE [1].

Actuellement, le nombre d'articles publiés sur l'activité antimicrobienne des plantes médicinales dans la base scientifique PubMed de 1996 à 2017, dépasse les 3515 articles, dont 2455 concernent particulièrement l'activité antimicrobienne des HE. Outre cet intérêt scientifique que suscitent les HEs, elles présentent également un énorme intérêt économique sur le marché mondiale où les échanges dépassent les 1000 M \$[2]. Les pays en voie de développement sont les premiers fournisseurs.

Sur le plan international, le marché est réparti entre les pays soutenus par un marché intérieur important, par une main d'œuvre à faible coût, et par une base de recherche développée, tel que l'Inde, la Chine et l'Indonésie, et ceux industrialisés assurant le tiers de la production mondiale des HE, soutenus par la maîtrise de la technologie et le développement et la recherche, par l'agriculture intensive, et par les organisations professionnelles. Le Maroc est considéré comme un pays disposant d'une biomasse abondante, ainsi qu'une main d'œuvre à faible coût ; Cependant, le niveau technologique scientifique et même réglementaire demeure insuffisant pour le développement du secteur [3]. L'USAID, estime la valeur des exportations marocaines en HEs à 56 millions de Dhs en 2000 à 112,4 millions Dhs en 2003. Dans ces chiffres, les PAM exportées sous forme de feuilles séchées ne considèrent que 5% pour utilisations thérapeutiques,

alors que 50% est destiné à l'alimentation, et 34% est destiné pour la parfumerie, au cosmétique et aux industries similaires.

La création de l'Institut national des plantes médicinales et aromatiques de Taouate, faisait partie de la politique adoptée par le Maroc pour la bonne gestion, exploitation et valorisation des PAM. L'institut avait plusieurs missions pour contribuer au développement de ce domaine, à l'augmentation de la production des PAM et ses sous-produits, et à la sauvegarde de la biodiversité végétale, ainsi que le contrôle de la qualité des produits[4].

Au Maroc de nombreuses plantes aromatiques et médicinales (PAM)s sont utilisées traditionnellement dans plusieurs domaines médicaux, pharmacologiques, cosmétologiques,...etc.

Compte tenu de cette richesse, la consécration d'une étude scientifique guidera l'application des PAM de manière rationnelle dans différents domaines. Particulièrement, les HE reconnues par leurs effets biologiques : antibactériens, antifongiques et antioxydants, et qui ont pu être largement utilisés en médecine et dans l'industrie alimentaire en tant que bio-agents versus les composés synthétiques, qui font face aux problèmes de résistance microbienne et de toxicité des antioxydants commerciaux. En effet, les HE et leurs composants présentent des activités prometteuses : contre de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire et les micro-organismes d'altération lors des tests *in vitro*, ainsi que contre les radicaux libres qui traduit son activité antioxydante. Cependant, dans les systèmes d'alimentation, des concentrations plus élevées des HE sont nécessaires pour exercer un effet antibactérien similaire à ceux obtenus dans les essais *in vitro*. Dans le souci de d'optimisation de leurs pouvoir antimicrobien et antioxydant, et pour éviter tout risque de toxicité du à la dose, l'utilisation de combinaisons devient donc une bonne approche.

En général, plusieurs méthodes sont mises au point pour évaluer l'effet antimicrobien combinatoire des HE. Cependant aucune d'elles n'est standardisée pour ce test.

Les plans de mélanges utilisés généralement pour la formulation, sont comme tous plans d'expériences, visent à limiter le nombre d'expériences réalisées, dont les résultats attendus peuvent être modélisés mathématiquement et graphiquement. Par conséquent, ils permettent de donner une vision générale sur le résultat de tout mélange possible en se basant sur des statistiques qui visent à minimiser l'erreur totale pour valider le model étudié. C'est une technique qui peut être largement appliquée dans la formulation des HE, tout en adoptant une méthode déjà standardisée comme la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque formulation, et apprécier par la suite leurs interactions produites.

De tout ce qui précède, nous présentons ce travail mené dans le cadre d'une thèse de doctorat réalisée au sein du laboratoire de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques. Neuf plantes aromatiques ont été choisies : l'*Origanum compactum*, l'*Origanum majorana*, le *Pelargonium asperum*, l'*Ormenis mixta*, le *Citrus aurantium*, le *Myrtus communis*, l'*Artemisia herba-alba*, la *Mentha spicata*, et le *thymus serpyllum*, dont l'optimisation de leurs propriétés médicinales ne fera qu'exhausser leur valeur économique.

Le travail effectué dans ce sens, sera détaillé dans le manuscrit présent. Quatre axes vont faire le socle de ce projet d'étude :

Le 1^{er} axe détaille, dans une revue bibliographique, les différentes connaissances liées aux HE, de l'écécité, la biosynthèse, la toxicité... jusqu'aux différentes méthodes d'extraction. Ainsi, un récapitulatif sur les HE et leurs composés concernant les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, et les différentes interactions des effets combinatoires seront décrites. Outre les différentes méthodes d'évaluations des effets étudiés, et finalement un rappel théorique des notions de base des plans d'expérience et des outils statistiques utilisés.

Le 2^{em} axe décrit l'étude établie à l'aide de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour déterminer la composition chimique de chaque HE.

Le 3^{em} axe englobe la réalisation d'un criblage de l'activité antibactérienne et la détermination de la CMI et la CMB.

Le 4^{em} axe donnera une vue d'ensemble sur l'efficacité antibactérienne des combinaisons en se basant sur la composition chimique de chaque HE, et en tirant parti de leurs effets additifs et synergiques. Cet axe s'est réparti en deux parties :

- ✓ Formulation binaire, établie à l'aide de la méthode de damier
- ✓ Formulation ternaire, établie à l'aide des plans d'expériences (plan de mélange)

Le 5^{em} axe détaillera le criblage antioxydant ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des combinaisons antibactériennes déjà réalisées, dans le but de choisir la composition adéquate pour un conservateur alimentaire ou pharmaceutique.

Partie I : Revue bibliographique

I. Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition :

Plusieurs organismes et associations chargés de la normalisation à travers le monde s'intéressent à définir l'essence des HEs. En effet, la définition établie par l'AFNOR en 1998 est révisée par ISO 9235 en 2013 est : « l'HE est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des *Citrus*, soit par distillation «sèche». L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [5]

2. Taxonomie des plantes produisant les huiles essentielles

L'analyse de la flore vasculaire du Maroc basée sur un inventaire récent, faisant état de 155 familles, 981 genres, 3913 espèces, 426 sous-espèces types (autonymes) et 872 sous-espèces additionnelles[6] Les plantes produisant les HE, appartiennent à environ 60 familles, les bien connues sont les Apiaceae comme *Petroselinum crispum* et *Coriandrum sativum* ; les Asteraceae comme *Ormenis mixta* et *Leucanthemum vulgare* ; les Lamiaceae comme *origanum compactum* et *thymus vulgaris* ; les Myrtaceae *Myrtus communis* et *Eucalyptus. Globulus* ; et les Rutaceae englobant les différents *citrus* [7]. Les rendements en HEs sont très variables d'une espèce à l'autre. Ainsi, ils s'influencent selon la région et la période de récolte, comme par les méthodes et les durées d'extraction.

3. Localisations des HE

Les HEs sont largement répandues dans le règne végétale, diffèrent en teneur d'une famille à une autre [8] [9], en localisation au niveau de l'organe [10] [11], comme au niveau du tissu sécréteur. En effet, les HEs sont synthétisées, accumulées et stockées dans des structures histologiques bien déterminées. On peut les distinguer comme Asbahani et son équipe [12]. Des tissus de sécrétion externes localisées à l'extérieur de la plante comme les papilles épidermiques observées sur les pétales de *Rosa rugosa* [13], les trichomes glandulaires observés chez les feuilles de *Mentha pepirita* [14] et les trichomes non-glandulaires observés chez *stachys ;lavandulifolia* [15], [16]. Et des tissus de sécrétions internes situés à l'intérieur de la plante comme les canaux sécréteurs observés chez les feuilles de *pinus pinaster*, les poches

schizogènes observées sur les feuilles de *Melaleuca alternifolia* et d'eucalyptus globulus [1], et les cellules sécrétrices intracellulaires observées chez *Laurus nobilis* [12].

4. Composition chimique et biosynthèse des HE

4.1. Classification

Les HEs sont des mélanges complexes et variables de constituants, dont les plus abondants sont les terpènes et les terpénoïdes, et les autres composés aromatiques et aliphatiques [17].

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont fabriqués à partir de combinaisons de plusieurs unités à base de 5 carbones (C5) appelées isoprène. De ce fait, une classification rationnelle, établie suivant le nombre d'unités isopréniques qu'ils contiennent est faisable. Ainsi on distingue les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterpènes (C25), les triterpènes (C30), les caroténoïdes (C40) et les polyisoprènes (Cn)[18].

4.2. Biosynthèse d'isoprène

L'origine biosynthétique de l'isoprène s'est affirmé par plusieurs auteurs. En effet, deux voies de biosynthèse conduisent aux unités isopréniques : voie de mévalonate, ou voie de MEP methylerythritol phosphate (2-C-méthyl-D-érythritol 4- phosphate).

4.2.1. La voie du mévalonate

La première étape de la voie du mévalonate commence par la condensation de trois unités d'acétyl-CoA en 3-hydroxyméthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA), sous l'effet de deux enzymes : l'acétoacétyl-CoA thiolase (ACTT) et le HMG-CoA réductase, sous l'effet du HMG-CoA réductase le HMG-CoA est réduit en mévalonate, ce dernier subi une phosphorylation sous l'action du mévalonate Kinase, pour produire le mévalonate 5-phosphate qui subira une deuxième phosphorylation produisant le mévalonate 5-diphosphate, qui, par une décarboxylation assuré par diphosphomévalonate décarboxylase, conduit à la formation de l'isopentényl diphosphate (IPP), produisant sous effet de IPP isomérase son isomère le diméthylallyle diphosphate (DMAPP).

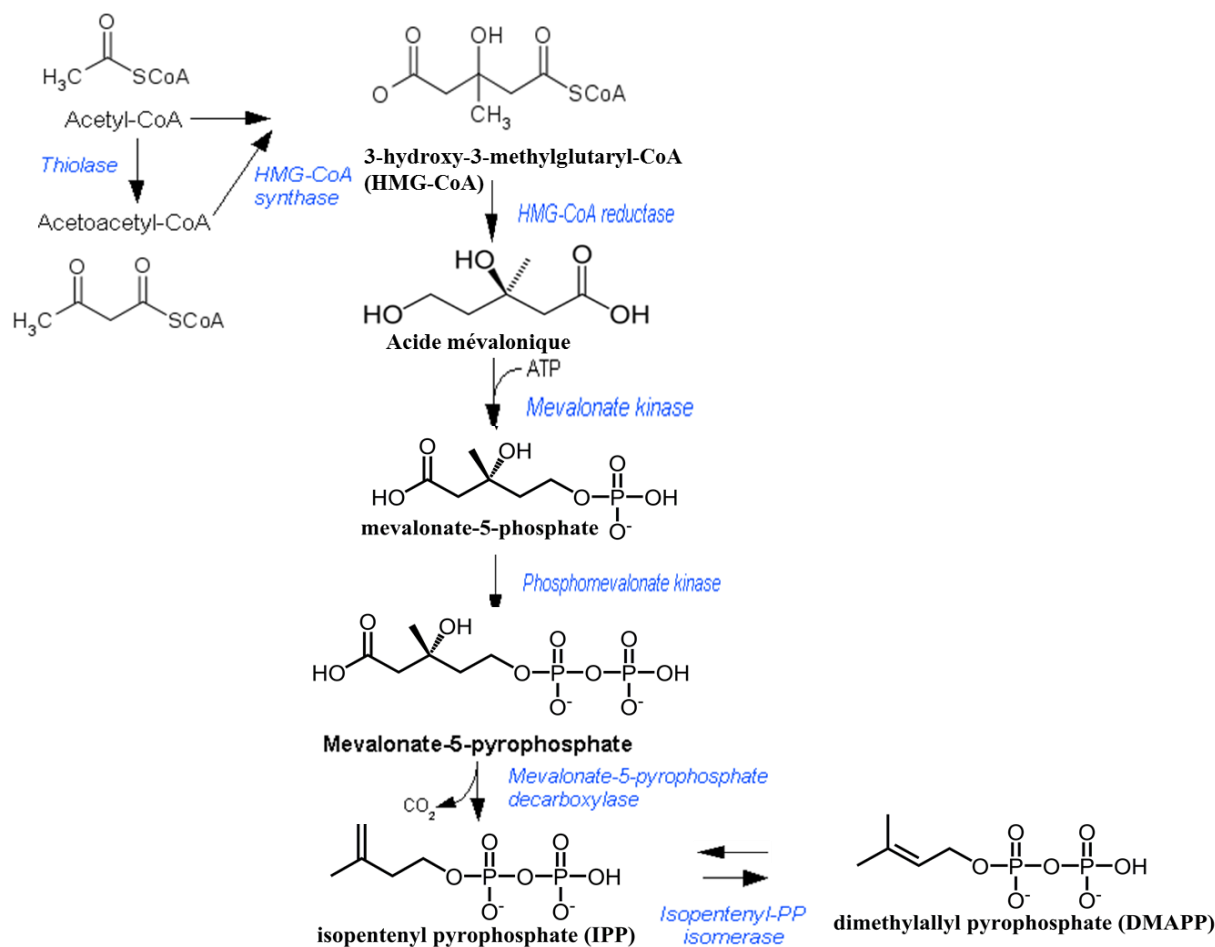


Figure 1 : Biosynthèse d'isoprène : La voie du mévalonate

4.2.2. La voie du MEP

Par une réaction de transcétolase, le glucose produit deux métabolites appelés le glycéraldéhyde 3-phosphate et le pyruvate qui se condensent pour donner le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), sous l'effet du DXP synthase et la thiamine diphosphate. Une série de métabolites intermédiaires se forme pour aboutir à l'IPP et au DMAPP, le 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythriol, le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-méthyl-D-érythriol, le 2-C-méthyl-D-érythriol 2,4 cyclophosphate, et le (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl.

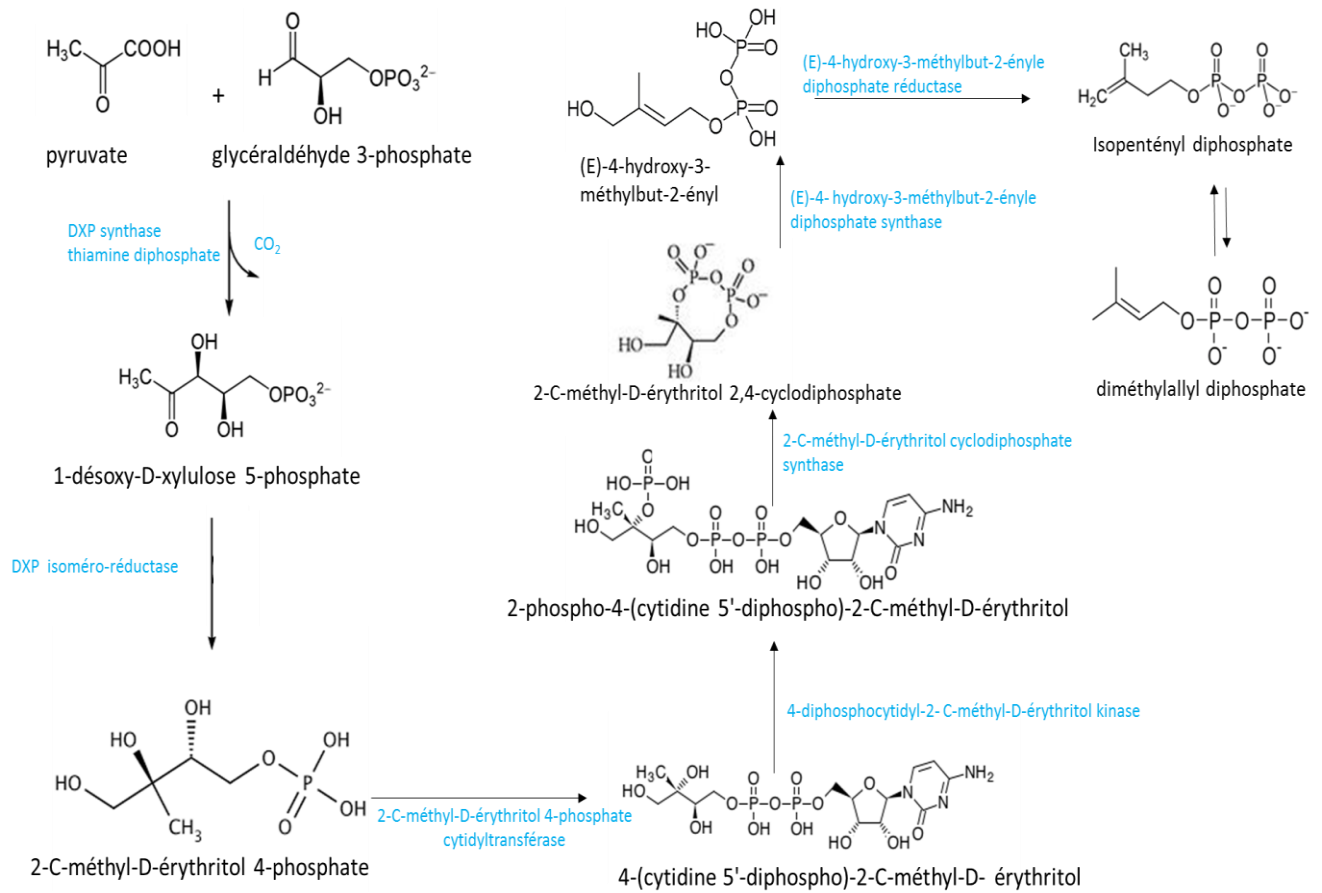


Figure 2 Biosynthèse d'isoprène : La voie du MEP

4.3. Biosynthèse de terpénoïdes

Des chaînes hydrocarbonées obtenues par juxtaposition "tête à queue" des unités isopréniques IPP et de son isomère DMAPP, ou par juxtaposition "tête-à-tête" de deux DMAPP donnent naissance respectivement, aux terpènes réguliers et aux terpènes irréguliers [1]. Ces chaînes peuvent ; par la suite ; perdre, ou acquérir des liaisons éthyléniques par hydrogénation ou déshydrogénation, comme ils peuvent subir une déphosphorylation, une oxygénation... pour aboutir aux formes connues des différents terpènes Figure (3).

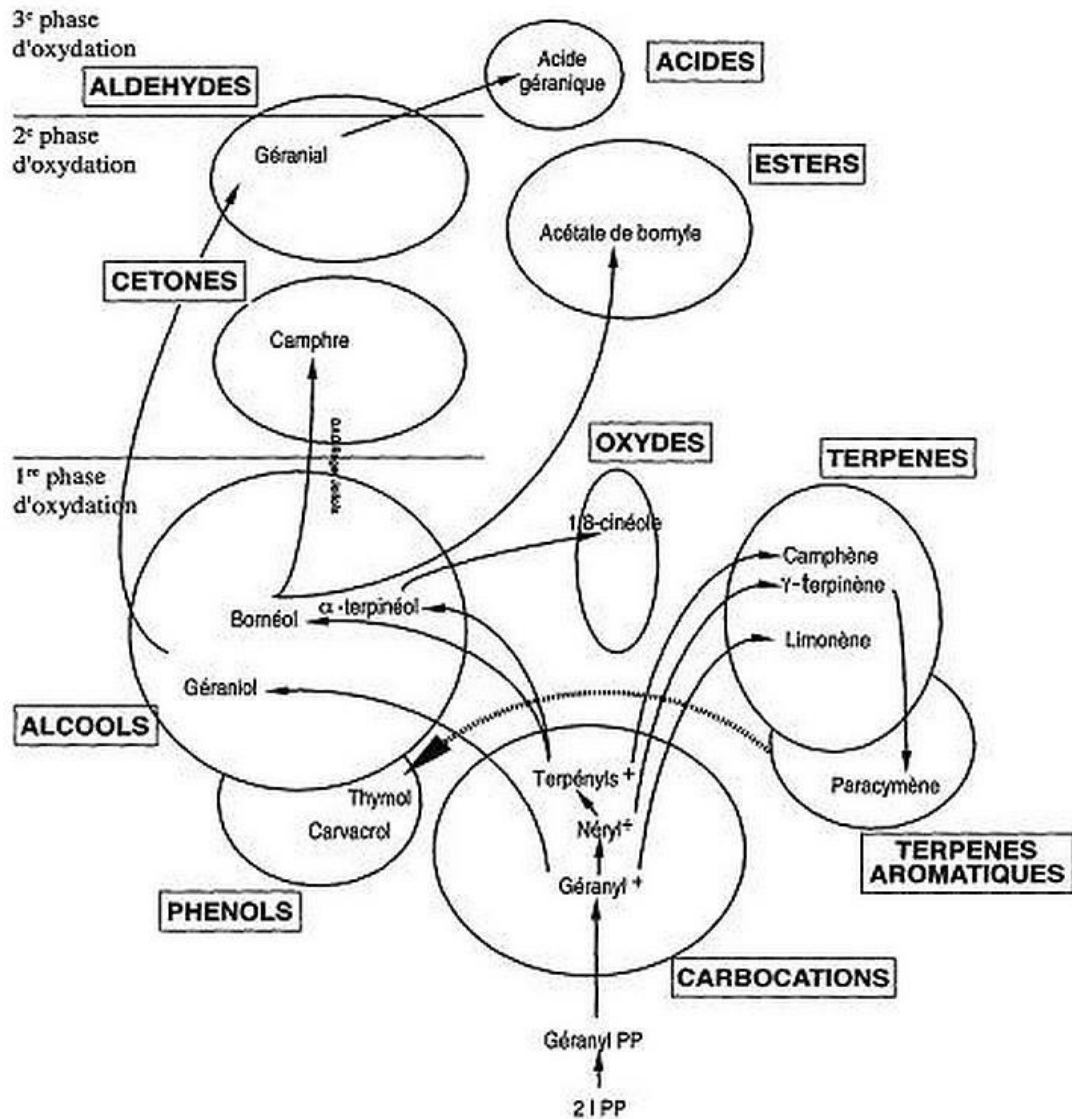


Figure 3 : Biosynthèse générale des terpénoïdes[1]

II. Paramètres Influençant le profil chimique des HE des plantes aromatiques

La composition chimique d'une HE se définit selon le profil obtenu du couplage de la chromatographie gazeuse avec la spectrométrie de masse (GC-MS), il est courant d'identifier plusieurs dizaines ou même des centaines de composants dans la même HE. Néanmoins, certaines HE ne contiennent que peu de composés qui déterminent leurs propriétés aromatiques, même si leurs contenus sont faibles. La composition chimique de chaque HE peut être influencée par la variabilité de plusieurs facteurs intrinsèques : Origine botanique [19], organe

extrait [10] , cycle végétal [20], et d'autres facteurs extrinsèques : facteurs écologiques [21], extraction[22], stockage et conditionnement [23].

III. Toxicité des huiles essentielles

La qualification d'un produit de toxique n'est pas toujours évidente, mais tout produit à effet négatif est défini par l'agence de protection d'environnement comme «tout changement biochimique, physiologique, anatomique, pathologique, et / ou un changement de comportement qui se traduit par une déficience fonctionnelle qui peut affecter la performance de l'ensemble de l'organisme ou de réduire la capacité de l'organisme à réagir à un défi supplémentaire ».

Toutefois, la toxicité est une propriété à double tranchant, dont l'aspect négatif est généralement connu et représenté chez les HE par la dermatotoxicité (irritation, allergies brulures), la toxicité orale induisant l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, et la neurotoxicité, et la toxicité par inhalation menant souvent a une toxicité pulmonaire [2]. Cependant, l'aspect positif est surtout reflété dans l'effet pesticide des HE : bactéricide, fongicide, insecticide...

Plusieurs mécanismes ont été développés pour décrire la toxicité des HE : cytotoxicité due à la nature lipophile des HE qui, chez les eucaryotes, provoque la dépolarisation de la membrane mitochondriale, affecte le cycle ionique du Ca⁺, ainsi que d'autres canaux ioniques et réduit le gradient de pH [17]. Et chez les bactéries, perturbe et perméabilise la membrane cytoplasmique, ce qui engendre la perte d'ions et la réduction du potentiel de la membrane, l'effondrement de la pompe à protons, appauvrissement en ATP, et fuite des macromolécules[24] [25]. Spécialement les phénols, qui ont montré qu'à petites doses, peuvent affecter les enzymes associés à la production des énergies, et à haute doses, peuvent dénaturer les protéines. Ils peuvent également interférer avec la fonction de la membrane et interagir avec les protéines membranaires, ce qui provoque une déformation de la structure et de la fonctionnalité [26].

Les réactions de toxicité sont généralement dose-dépendantes, des doses qui diffèrent suivant la voie d'application [27], [28], et qui engendrent des intoxications graves juste à la suite d'ingestion orale d'une quantité de huile beaucoup plus élevées que la dose thérapeutique [31].

La composition chimique complexe des HE rend difficile l'analyse de leur toxicité, pour cela, plusieurs études ont concédé de lier cet effet à l'abondance des composés démontrés toxiques.

Généralement, les composés majoritaire des HE, surtout celles riches en phénols (carvacrol, thymol) ; aldéhydes (cinnamaldéhyde), et terpenes oxygénés (cétones, éthers...), sont qualifiés responsables de l'effet bactériostatique ou bactéricide [17], [29], [30]. Cette toxicité vis-à-vis les bactéries est amplement recherchées, ainsi, beaucoup de chercheurs essaient de l'amplifiée par mélange, surtout que les terpenes sont avérés capables d'accroitre l'effet antibactérien de certaines molécules pures comme des antibiotiques[31], ou des extraits de plantes[32], et même celui des autres huiles [33].

Chez l'homme, l'ingestion des terpenes comme le limonène entraine la diarrhée et la protéinurie ; et des troubles digestifs et des irritation de la peau et des muqueuses oculaires une fois exposé à la vapeur [34]. Autres plantes riches en 1,8 cineole, pulégone, camphre, développent les convulsions chez l'homme[35]. Ainsi la richesse de l'absinthe, et le Plectranthe en sabinyle acétate induit la foetotoxicité [28], [36]. Cependant, la combinaison de l'acétate de linalyle, le terpeneol et le camphre de la sauge libanaise (*S. fruticosa*) a provoqué une inhibition synergique de la croissance de deux lignées de cellules du cancer du côlon humain, alors que, individuellement, ils sont dépourvu de cet effet [37]. Comme parfois un composé peu avoir un effet antagoniste comme l'eugénol et le D-limonène qui inhibe l'effet du cinnamaldéhyde causant l'urticaire [38]

IV. Procèdes d'extraction des HE

1. Méthodes conventionnelles :

Les méthodes adoptées pour l'extraction des HE sont liées à plusieurs facteurs : le solvant utilisé pour l'extraction (Eau, solvant organique...) ; la phase du solvant (liquide, gaz, supercritique) ; état de la plante à extraire (broyée, entière...) ; l'énergie transmise pendant l'extraction (chaleur, onde...), on en cite :

1.1. Extraction par entrainement à la vapeur

- Distillation par entrainement à la vapeur : La matière végétale doit être soumise à un entrainement de la vapeur d'eau du bas en haut, sans être macérée dans l'eau [39] [40].
- Hydro-distillation : La matière végétale est émergée dans l'eau, HE est entrainé avec la vapeur d'eau après ébullition.
- Hydro-diffusion : La matière végétale doit être soumise à un entrainement de la vapeur d'eau du haut en bas, sans être macérée dans l'eau [5].

- Turbo-distillation : La matière végétale subit une agitation considérable avec cisaillement et effet destructeur, en réduisant l'énergie, la consommation d'eau pendant l'ébullition et le refroidissement utilisé en hydro-distillation. Permet d'extraire aussi les HE des épices et du bois difficile à extraire
- Extraction à distillation simultanée (Simultaneous distillation extraction) : l'hydrodistillation ou distillation à vapeur est combinée avec l'extraction au solvant qui est fréquemment utilisé pour l'isolement de composés volatils à partir de plantes portant HE. Le solvant utilisé doit être insoluble dans l'eau et d'une grande pureté[5] [41].

1.2. Expression à froid :

Ce procédé mécanique est basé sur la machine en serrant les péricarpes d'agrumes à la température ambiante[42].

2. Autres méthodes innovantes

2.1. La technique de désorption thermique directe :

Une méthode très utilisée pour l'extraction des composés volatils qui ne sont pas rapportés par extraction liquide-liquide. Le système DTD permet l'analyse des molécules prélevées sur des tubes adsorbants constitués souvent de polymères organiques, dont le plus thermiquement stable est le TENAX[43].

2.2. Extraction par sonication

Les cellules du matériel végétal sont éclatées par des ultra-sons, c'est une extraction qui vise l'optimisation du rendement avec réduction d'énergie et de temps, les HE obtenues montrent la moindre dégradation thermique avec haute qualité et bonne saveur[44]

2.3. Extraction assistée par micro-onde

Micro-ondes est une source de chaleur sans contact qui peut réaliser un chauffage plus efficace et plus sélective, avec eau solvant ou sèche, la distillation peut être terminée en quelques minutes au lieu de quelques heures [45].

2.4. Extraction assistée par champ électrique pulsé

Appellée aussi "Pulsed electric field assisted extraction". Cette technique utilise des impulsions courtes à haute tension afin de créer une électro-compression, ce qui éventre et perfore les

cellules végétales. La chambre de traitement est constituée d'au moins deux électrodes avec une région isolante entre les deux[5].

2.5. Extraction par pression instantanée contrôlée

Le processus DIC est une technique d'extraction-séparation directe. Il permet aux composés volatils d'être éliminés par évaporation pendant une courte période à haute température haute pression, ce qui assure une économie d'énergie, de temps, et une haute qualité[46].

2.6. Extraction par fluide supercritique (ESF)

Plusieurs gaz en phase supercritique comme le dioxyde de carbone ($T_c = 31\text{ °C}$, $P_c = 74\text{ bars}$) ; l'eau ($T_c = 374\text{ °C}$, $P_c = 227\text{ bars}$), l'ammoniac ($T_c = 132\text{ °C}$, $P_c = 115\text{ bars}$) ; le méthanol ($T_c = 240\text{ °C}$, $P_c = 79\text{ bars}$) et l'éther éthylique ($T_c = 194\text{ °C}$, $P_c = 36\text{ bars}$) sont utilisés pour l'extraction des HE[5][42][44], dont les plus utilisés sont :

- Extraction par CO_2 supercritique (Supercritical fluid extraction): Le matériel végétal est placé dans un extracteur avec un flux de CO_2 à l'état supercritique, la nature lipophile du CO_2 comme solvant, avec le fort coefficient de diffusion assure une bonne diffusion, et la forte densité allant de gaz au liquide dote de la capacité du transport et de l'extraction majeur. Les extraits fluides porteurs passent à travers la phase gazeuse. Les extraits sont ensuite séparés et collectés.
- Extraction par eau supercritique : Dans ce cas l'eau utilisée est chaude, et elle est entre sa température d'ébullition (100 °C) et le point critique ($374,1\text{ °C}$), la pression maintenue l'eau sous sa forme liquide, ce qui diminue sa polarité, ce qui permet l'extraction de molécules moyennement polaires et non polaires.

2.7. Distillation destructive

La matière végétale subit un processus de destruction sous la chaleur intense. Une huile typique, coriace et empyreumatique est obtenue [47].

3. Etude comparative des méthodes d'extraction des HE

Plusieurs méthodes d'extraction ont été avérées utiles pour l'obtention des HEs, ainsi, plusieurs comparaisons ont été établies pour vérifier leur efficacité, de point de vue économie d'énergie, rapidité de traitement, qualité des huiles, impact sur l'environnement etc...

La DEV a été qualifiée la plus adéquate pour l'extraction du l-menthol, menthone, et l'eucalyptol de la menthe poivrée en la comparant avec l'extraction par eau surchauffée, et extraction par ESF [48]. Ainsi, la comparaison de la DEV et l'ESF pour l'extraction de *Zingiber corallinum*, a révélé deux compositions chimiques avec moins de composés dans la première [49]. L'extraction de *Ziziphora taurica* par entraînement à la vapeur, par eau surchauffée, et par DTD, a montré que l'entraînement à la vapeur était rentable en quantité de l'huile, pendant que le DTD était rentable en nombre de molécules extraites [50].

L'obtention de l'HE d'*Inula helenium* par hydrodistillation a été comparée à celle par co-hydrodistillation à l'Ethyl heptanoate, cette dernière a été plus rentable en quantité et en nombre de composé révélé par la CG/MS [51]. l'HE de *Rosmarinus officinalis L* obtenue par hydrodistillation a été comparé par S. Karakaya et al [52] à celle obtenue par extraction assistée par micro-onde, les deux mode d'extraction ont donné le même rendement, pendant que l'extraction par micro-onde possédait la meilleur activité antioxydante et antibactérienne. La même comparaison a été portée par M. H. S. Sourmaghi et al [53] sur *Coriandrum sativum L*, où Le montant total des hydrocarbures mono-terpéniques obtenus par hydrodistillation était significativement supérieur, avec obtention d'HE à effet antibactérien considérable versus celle obtenue par micro-onde. Toutefois, l'extraction par micro-onde était meilleure en termes d'économie d'énergie et en temps d'extraction, bien que le rendement de l'huile et de la composition totale diminue en utilisant cette méthode.

V. Pouvoir antibactérien des HEs

1. L'activité antibactérienne des HEs et leurs composés

Les plantes ont la capacité de synthétiser un nombre illimité de métabolites secondaires aromatiques capable d'assurer leur protection contre les bactéries et les champignons, dont la plupart sont des phénols ou leurs dérivés oxygénés [17].

Les recherches axées sur les plantes médicinales ont conduit à la détermination de plusieurs HE à effet antibactérien, ainsi qu'à l'isolement et l'identification d'un large éventail de composés avec une diversité structurelle avec une activité antibactérienne potentiel. La plupart des études ayant expliqué l'effet antibactérien des HE ont été basées principalement sur le chémotype [54]. En effet, plusieurs plantes comme le thym, l'origan à carvacrol ou à thymol ont inhibé la croissance de différentes souches bactériennes et fongiques, ainsi que l'HE de *Syzygium*

aromaticum et de *Cinnamomum verum* à eugénoï, de concentration respectivement de 76.4–84.8% et 68.6–87.0%. Autres huiles à linalool comme *Coriandrum sativum* 59.0–87.5% *Cinnamomum camphora* 66.7–90.6% sont considérées des huiles à effet antibactérien [55].

Généralement, les études ont rapporté que les HE contenant des aldéhydes ou des phénols tels que le cinnamaldehyde, le citral, le carvacrol, le géraniol le thymol ou l'eugénoï[56]–[59], suivie par des HE a alcools terpéniques sont dotées d'un pertinent effet antibactérien. Cependant, les HE contenant des cétones ou des esters, tels que les β -myrcène, α -thujone ou l'acétate de géranyle avaient une activité beaucoup plus faible. Tandis que les huiles volatiles contenant des hydrocarbures terpéniques étaient généralement inactives[17].

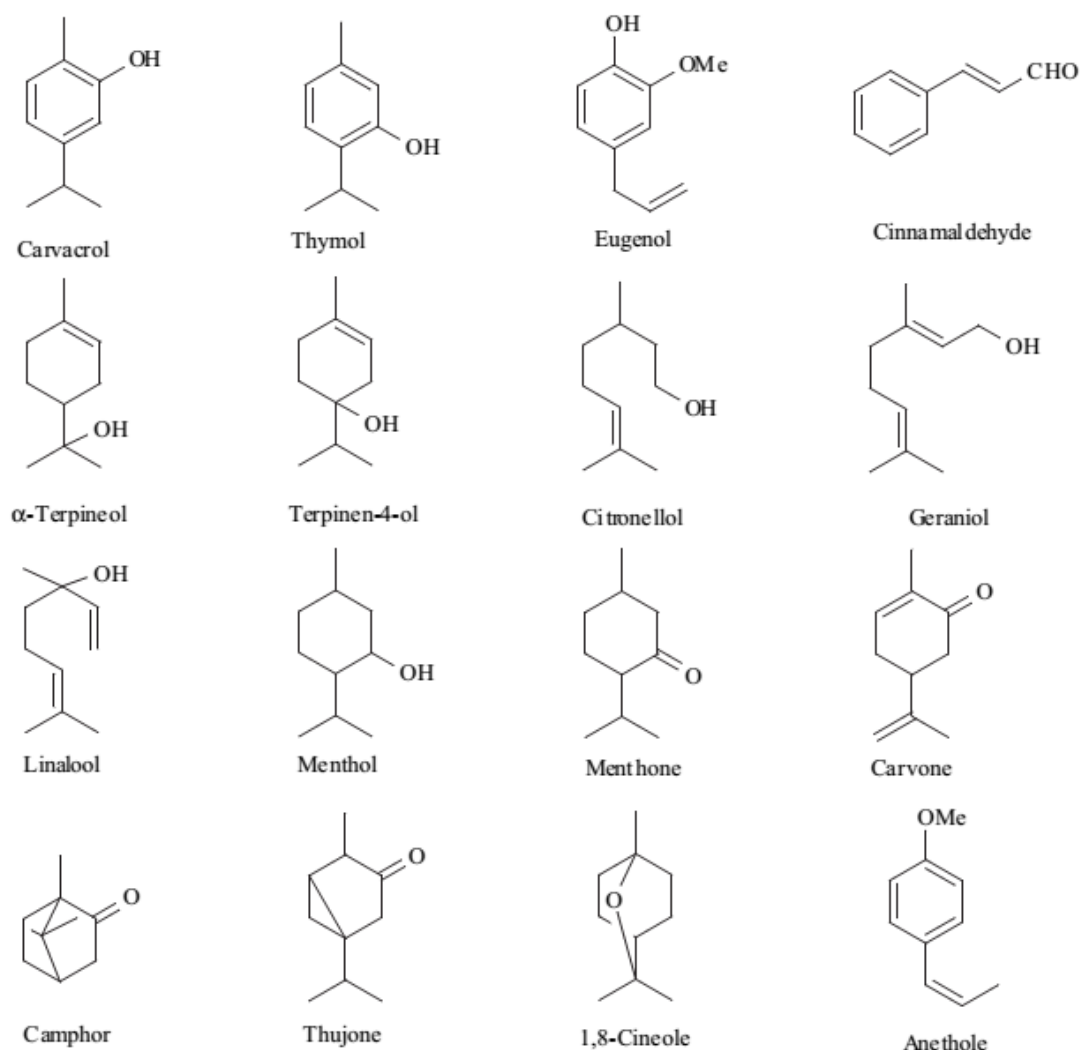


Figure 4: Terpènes antibactériens

2. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien des HEs

En science biologique, le test de sensibilité aux antibactériens garde son aspect technique, où la différenciation des méthodes employées par plusieurs chercheurs mène à des résultats distincts. En effet, chacune des méthodes adoptées pour ce test, a ses pratiques spécifiques concernant la nature du milieu (solide, liquide...), la nature d'émulsifiant de l'antimicrobien (solvant, agar...), la nature du germe (Champignon, bactérie...). Certaines de ces méthodes sont utilisées pour l'évaluation des HE, on en cite :

2.1. Méthodes de diffusion

- Diffusion sur disc

La méthode de diffusion sur disques d'agar du test antimicrobien a été développée en 1940 [60]. La procédure qui a été acceptée par le NCCLS et largement utilisée pour les extraits de plante et les HE pour cribler leur activité antibactérienne par plusieurs chercheurs [61], [62]. Cette méthode vise à imprégner des disques de papier filtre stérilisés avec l'HE pure ou émulsifiée à une concentration souhaitée, et les laisser diffuser sur la surface d'un milieu gélose solide approprié comme Mueller Hinton [63], gélose de soja tryptone ou gélose nutritive [64]. Les milieux doivent être pré-inoculés avec un inoculum de référence de 10^8 UFC/mL, qui est égale à 0,5 McFarland [65]. L'incubation est ensuite réalisée dans les conditions optimales du germe testé.

- Diffusion en puits

Le principe de la diffusion en puits est similaire à celui sur disque. Une concentration de l'inoculum standardisé à volume fixe est répartie uniformément sur la surface de plaque de gélose. Un trou qui varie de 6 à 8 mm de diamètre est perforé de façon aseptique avec un bouchon de pyrale stérile dans le milieu. Un volume fixe de l'HE est ensuite introduit dans le puits ennuyé, puis les boîtes sont incubées dans les conditions optimales du germe testé [66].

Ces deux méthodes ne sont pas standardisées et moins adaptées pour l'étude de l'activité antifongique. Cependant elles peuvent être utilisées pour des tests de criblage.

- Test de germination des spores

L'activité antifongique des HE peut être évaluée par dosage de la germination des spores [67]. Où à la fin de la période d'incubation, les spores germées sont observées en utilisant un

microscope optique. L'étendue de la germination des spores est évaluée en recherchant la présence des tubes germinatifs. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage de spores germées par rapport au control à partir de la moyenne des trois répétitions.

- Détermination de l'inhibition de croissance fongique par la technique d'incorporation dans le milieu de culture

A partir d'une vieille culture fongique, des plots sont perforés de façon aseptique avec un perce-bouchon stérile. Les disques fongiques sont ensuite mis sur plaques gélosées, et déjà imprégnées d'HE à une température de 45 - 50 ° C. Les plaques sont ensuite incubées à température 26 ± 1 ° C pour les champignons. Diamètre de la colonie est enregistré par mesure des deux cercles opposés de la croissance de la colonie [68], [69]. Le pourcentage d'inhibition de la croissance du mycélium est évalué en comparant le diamètre de la colonie de la plaque à huile et la plaque avec de l'eau distillée.

- Bioautographie

C'est une variante de la méthode de diffusion sur gélose où l'analyte est adsorbé sur une plaque de Chromatographie sur couche mince. La bioautographie est également utilisée comme une technique de criblage de substance phytochimique préliminaire, par bio-guidage à l'aide de fractionnement, pour détecter des composants actifs

2.2. Méthodes de dilution

Le principe de la dilution soit en micro-titrage ou macrodilution en milieu liquide permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un grand nombre d'échantillons d'essai. La CMI en microbiologie est la plus faible concentration d'agents antimicrobiens qui inhibent la croissance de micro-organismes visible après incubation pendant une nuit. Elle est définie par la différence logarithmique de décroissance de la population (log DP). Le Log DP est exprimé suivant l'équation suivante :

$$\log DP: \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log N - \log N_0$$

N est la population après une incubation de 24h, et N₀ et la population initiale, la CMI est définie par la plus faible concentration qui peut maintenir ou réduire la viabilité de l'inoculum

($\log DP \leq 0$). La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la concentration qui tue 99.9% ou plus de la population initiale ($\log DP \leq -3$) [70].

2.3. Effet antibactérien combinatoire des HE

Les HEs sont parmi les produits naturels reconnus par leurs propriétés thérapeutiques antibactériennes. En effet, les HE et leurs composants montraient des activités prometteuses contre de nombreux agents pathogènes lors des tests in vitro. Cependant, dans la conservation alimentaire ou pharmaceutique, des concentrations plus élevées sont utilisées pour assurer le même effet obtenu dans les essais in vitro [71], [72]. En revanche, l'utilisation de combinaisons d'HE ou de leurs composants isolés est une approche efficace adoptée par plusieurs chercheurs, et qui permet d'augmenter l'efficacité conservatrice des HE, en tirant avantage de leurs effets additifs et synergiques.

2.4. Interactions entre les HE et entre leurs composés

Différents composants de terpènes d'HE peuvent interagir pour réduire ou augmenter l'efficacité antimicrobienne. L'interaction entre les composés peut produire quatre types possibles d'effets : additif, antagoniste, synergique ou indifférent. Un effet additif est observé lorsque l'effet combiné est égale à la somme des effets individuels. L'antagonisme est observé lorsque l'effet des deux composés est moindre quand ils sont associés, inversement s'ils sont appliqués individuellement. La synergie est observée lorsque l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels tandis que l'absence d'interaction est définie comme indifférence[29]. Ces interactions entre les HE peuvent se produire dépendamment de plusieurs facteurs : la configuration chimique des composants, leurs interactions intrinsèques dans la même huile, les proportions dans lesquelles elles sont présentes, ainsi que les souches microbiennes étudiées [73].

Plusieurs combinaisons d'HE ont été testées, et ont montré différentes interactions, dont l'effet antimicrobien produit n'a pas pu être négligé par les différents chercheurs de ce domaine, et plusieurs combinaisons ont été mises en valeur.

Par ailleurs, les monoterpènes et les phénylpropanoïdes (montrant généralement de fortes activités antimicrobiennes) ont été testés en combinaison avec d'autres composés, et ont prouvé leur capacité d'interagir en synergie avec ces derniers [30], en fait, la plupart des études ont été portées sur l'interaction de monoterpènes phénoliques (thymol, carvacrol) et phénylpropanoïdes

(eugénol) avec d'autres groupes de composants, en particulier avec d'autres phénols, phénylpropanoïdes et monoterpènes alcools, tandis que les monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbures ont été moins étudiés, Tableau(1).

Certaines études ont conclu que les HE entières avaient une activité antibactérienne supérieure à celle des principaux composants [74] ce qui suggère que les composants mineurs sont critiques pour l'activité et peuvent avoir un effet synergique potentiel. Ce qui a mené plusieurs études à évaluer les combinaisons entre les HE entière.

Tableau 1 Interactions antimicrobiennes des combinaisons des HEs, et de leurs composés, contre plusieurs micro-organismes

Combinaisons	Souches bactériennes	méthode	Interactions	Références
<i>O.vulgare/Rosamarinus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Damier	Synergie	Azeredo <i>et al</i> [75]
<i>officinalis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>		Synergie	
	<i>A. hydrophilla</i>		Synergie	
	<i>P. fluorescens</i>		Addition	
<i>O.vulgare/O. majorana</i>	<i>B. cereus</i>	Damier	Addition	Guttierrez <i>et al</i> [76]
	<i>E. coli</i>			
	<i>P. aeruginosa</i>			
<i>O.vulgare/T. vulgaris</i>	<i>B. cereus</i>			
<i>O.vulgare/R. officinalis</i>				
<i>O.vulgare/M. officinalis</i>				
<i>O. vulgare/S. triloba</i>				
<i>O.vulgare/O. basilicum</i>				
<i>O. basilicum /O. majorana</i>	<i>L. monocytogenes</i>			
<i>O. basilicum/ T. vulgaris</i>				
<i>R. officinalis/O. majorana</i>				
<i>R. officinalis/T. vulgaris</i>				
<i>S. triloba/O. majorana</i>				
<i>S. triloba/T. vulgaris</i>				

<i>L. multiflora/M. piperita</i>	<i>S. aureus</i>	Damier	Addition	Bassolé <i>et al</i> [77]
	<i>E. faecalis</i>		Synergie	
	<i>L. monocytogenes</i>		Synergie	
	<i>E. coli</i>		Synergie	
	<i>S. enterica</i>		Indifférence	
	<i>S. typhimurium</i>		Synergie	
	<i>S. dysenteria</i>		indifférence	
<i>L. multiflora/ O. basilicum</i>	<i>S. aureus</i>		Indifférence	
	<i>E. faecalis</i>		Synergie	
	<i>L. monocytogenes</i>			
	<i>E. coli</i>			
	<i>S. enterica</i>			
	<i>S. typhimurium</i>			
	<i>S. dysenteria</i>			
<i>M. piperita/ O. basilicum</i>	<i>S. aureus</i>		Synergie	
	<i>E. faecalis</i>		Synergie	
	<i>L. monocytogenes</i>		Synergie	
	<i>E. coli</i>		Synergie	
	<i>S. enterica</i>		Indifférence	
	<i>S. typhimurium</i>		Addition	
	<i>S. dysenteria</i>		synergie	
<i>Thymol/carvacrol</i>	<i>S. aureus</i>	Mélange	Addition	Lambert <i>et al</i> [25]
	<i>P. aeruginosa</i>			
	<i>S. aureus</i>	Damier	Antagonisme	Gallucci <i>et al</i> [78]
	<i>B. cereus</i>			
	<i>E. coli</i>			
	<i>E. coli</i>	Damier	Synergie	Pei <i>et al</i> [70]
<i>Carvacrol/eugénol</i>	<i>E. coli</i>	Damier	Synergie	

	<i>S. aureus</i>	Damier	Antagonisme	Gallucci et al [78]
	<i>B. cereus</i>			
	<i>E. coli</i>			
Thymol/eugénol	<i>E. coli</i>	Damier	Synergisme	Pei et al [70]
Thymol/menthol	<i>S. aureus</i>	Damier	Antagonisme	Gallucci et al [78]
	<i>B. cereus</i>		Synergie	
	<i>E. coli</i>		Antagonisme	
Eugénol/menthol	<i>S. aureus</i>	Damier	Indifférence	
	<i>B. cereus</i>			
	<i>E. coli</i>			
Carvacrol/cinnamaldéhyde	<i>E. coli</i>	Damier	Addition	Pei et al [70]
			Synergie	
Thymol /cinnamaldéhyde			Synergie	
Eugénol/ cinnamaldéhyde				
Aromadendrène/ 1,8 cinéol	<i>S. aureus</i>	Damier	Addition/synergie	Mulyaningsih et al [79]
	MRSA		Addition/synergie	
	<i>B. subtilis</i>		Addition/synergie	
	<i>S. pyogenes</i>		Addition/synergie	
			Addition/synergie	
Linalool/α-pinène	<i>S. cerevisiae</i>	Damier	Addition	Tserennadmid et al [80]
Limonène/ α-pinène			Synergie	
Terpinén-4-ol/ α-pinène			Indifférence	
Linalool/Terpinèn-4-ol			Addition	

2.5. Méthodes d'évaluation du pouvoir antimicrobien combinatoire

La détermination de l'ensemble des effets antimicrobiens combinatoires, et l'explication des différentes interactions pouvant se produire, se basent sur des techniques distinctes. Damier, et la cinétique de l'effet bactéricide (Time-kill) sont les plus utilisés [81]. Ces procédés ont été mis au point pour la détection de la synergie entre les HE, cependant il n'y a aucune méthode normalisée développée pour évaluer ce type d'interaction.

- La méthode de Damier (checkerboard)

La méthode du Damier, qui se base sur la microdilution, nécessite la détermination de la concentration inhibitrice fractionnaire (CIF). La CIF d'un facteur A est la concentration bactéricide lorsqu'il est utilisé en combinaison avec un autre agent B, divisée par la concentration minimale inhibitrice du facteur A utilisé seul, qui mène au calcul de l'indice de CIF, qui est la somme des CIF des deux facteurs A et B en combinaison, et qui définit la nature de leur interaction [77], [82], [83].

$$\sum \text{ICIF} = \text{CIF(A)} + \text{CIF(B)} \quad \text{Eq: 1}$$

D'où

$$\text{CIF (A)} = \frac{\text{CMI (A) en combinaison}}{\text{CIM (A) seul}} \quad \text{Eq: 2}$$

Et

$$\text{CIF (B)} = \frac{\text{CMI (B) en combinaison}}{\text{cmi (B) seule}} \quad \text{Eq: 3}$$

Les valeurs de l'indice CIF diffèrent suivant les auteurs, tableau(2), ce qui rend difficile la comparaison entre les études.

Tableau 2 : Indice de CIF adopté par différents auteurs

Indice de CIF				Références
Synergie	additivité	Indifférence	Antagonisme	
≤0.5	0,5-2	-	>4	Basri <i>et al</i> [83]
≤0.5	-	0.5-4	>4	Yap <i>et al</i> [84]
≤0.9	0.9-1.1		>1.1	Patrone <i>et al</i> [85]
≤0.5	0.5-1	1-4	>4	Gutierrez <i>et al</i> [71]
<1	=1	1-2	>2	Pei <i>et al</i> [70]
≤0.5	0.5-4	-	>4	De Azeredo <i>et al</i> [75]

La détermination par l'effet de la combinaison (EC), est une autre valeur utilisée par d'autres auteurs [70], et qui permet de déterminer le type d'interaction dans le mélange en se basant sur les principes suivants :

- ✓ Suivant la définition de diminution de la population, il a été conclu que seulement lorsque $DP < 0,1$ ($\log DP < -1$) que les combinaisons des différents réactifs ont une activité antibactérienne significative.
- ✓ Quand il n'y a pas de différence significative (ANOVA) entre l'activité antibactérienne de la combinaison des composants individuels, cela signifiait que la combinaison est efficace.
- ✓ La synergie est définie comme une diminution de $2\log$ d'unités formant colonie dans le groupe de la combinaison de médicaments par rapport à l'agent unique le plus efficace à la fin de 24 h
 - Méthode de Cinétique de l'effet bactéricide (Time-kill method) :

Cette méthode se base sur l'établissement d'une étude de la cinétique de la croissance bactérienne censée être inhibée par la présence d'un agent bactéricide. Différentes concentrations de mélanges d'HE peuvent être testées. Un comptage est effectué pour chaque boîte après des intervalles de temps pour décrire le développement de la croissance bactérienne[79][86].

VI. Pouvoir antioxydant des HEs

1. Effet oxydant/antioxydant

Les radicaux libres sont les principaux produits de l'oxydation, ils représentent des espèces chimiques réactives qui possèdent un électron non apparié sur l'orbite externe, et à la fois stables dans leur forme[87]. La réaction d'oxydation dans le corps et dans les denrées alimentaires a été largement reconnue. Elle peut engendrer la dégradation de différents substrats à oxygène, les acides gras polyinsaturés, les phospholipides, le cholestérol, les lipides et l'ADN.

Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote à connaître sont : L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxyde, le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), oxygène singulet ($1/2 O_2$), peroxyde nitrite ($ONOO^-$)[88], l'oxyde nitrique. Ainsi que l'azote, le fer, le cuivre, et les dérivés de soufre sont également rencontrés[87].

Le contrôle de l'oxydation, dans les différents domaines, est basé sur l'utilisation d'antioxydants, qui sont par définition, des composés susceptibles de ralentir ou retarder l'oxydation d'un matériau oxydable, même lorsqu'il est utilisé en quantité très faible (<1%, généralement de 1 à 1000 mg / L) par rapport à la quantité de matière qu'ils doivent protéger [89].

Les antioxydants sont classés en deux catégories suivant leur mécanisme d'action. Les préventifs, agissent par trois différents mécanismes, la diminution de la concentration d'oxygène ; la prévention des chaînes d'initiation par piégeage des radicaux initiateurs ; ou par blocage des ions métalliques pour ne pas générer des espèces des hydroxyles, des ferryl $Fe^{2+}/Fe^{3+}/O_2$, et/ou décomposer les peroxydes lipidiques à des radicaux de peroxydes ou alkoxydes. Cependant, les primaires, réagissent par deux mécanismes, par la décomposition des peroxydes par leur conversion à des produits non-radicalaires ; ou par rupture des chaînes réactionnelles, en piégeant les radicaux intermédiaires, et empêcher l'abstraction d'hydrogène continue [88].

2. Activité antioxydante des HE et leurs composés

Les antioxydants présents dans les PAM sont nombreux, et plusieurs études ont été consacrées à démontrer leur capacité antioxydante et celle de leurs HE. En effet, les PAM qui génèrent par photosynthèse leurs énergies à l'aide des UV, génèrent des molécules pour se protéger de la photo-oxydation et s'adaptent pour éliminer efficacement les radicaux libres[90].

Jusqu'à présent, les composés phénoliques sont considérés comme les antioxydants les plus efficaces grâce à leur haute réactivité avec les radicaux peroxydes. En effet, le thymol, le carvacrol, et l'eugénol ont pu être intégrés dans le système alimentaire et la médecine complémentaire [89]. Ainsi, benzyle alcool, 1,8 cinéol, (-)-menthol, (6R)-(+)-menthofurane, (-)-methyl acétate, methyl salicylate, et thymoquinone [36] ont été rapportés comme des terpènes antioxydants. Certains aldéhydes insaturés, y compris (E)-cinnamaldehyde, citral, périllaldéhyde et safranal, induit la production de la thiorédoxine qui est un antioxydant produit par le corps humain, et qui régule les processus redox cellulaires[91]. D'autres terpénoïdes ayant une structure de cyclohexadiène, tels que γ -terpinène, et α -phellandrene agissent comme antioxydant grâce à leur auto-oxydation. Alors que l'auto-oxydation qu'autres terpènes comme le α -pinène ne génère aucune protection antioxydante [89].

En général, l'activité antioxydante des HE peut être expliquée par l'effet de ses composés majoritaires. Ainsi peut être le résultat d'interactions complexes entre la totalité des composants, ou aussi leur interaction avec la matière oxydable à protéger[89].

3. Méthodes d'évaluation d'activité antioxydante

Les méthodes ayant servi à l'évaluation de l'activité antioxydante, suivent différentes stratégies analytiques, comme la mesure du taux de réaction, de la phase de latence, de la fréquence intégrée, ou encore de la mesure à un point de temps fixe [92].

L'activité antioxydante peut s'expliquer par différentes interventions mécaniques par 1)Piégeage des radicaux libres ;2) décomposition catalytique, 3)suppression des pro-oxydants, 4)mesure du taux de balayage,5) la sélectivité du milieu ou du substrat,6)l'efficacité de la concentration, ou encore par l'effet synergique avec d'autres antioxydants [92].

Les tests les plus utilisés pour la mesure de l'activité antioxydante sont nombreux, on en cite :

3.1. Mesure des radicaux libres

Cette approche vise à mesurer la capacité antioxydante en mesurant la capacité à piéger les radicaux libres. Plusieurs types de radicaux existent : radical hydroxyle, radical superoxyde et radical oxyde nitrique (DPPH, ABTS+...). Le changement de couleur est mesuré par une lecture d'absorbance qui sert à quantifié l'effet antioxydant [93].

3.2. β -carotène

Ce test consiste à mesurer la décroissance de l'absorption à 470 nm due à la β -carotène sous un flux de radicaux libres générés par l'oxydation spontanée de l'acide linoléique à la température de l'essai (50 ° C), en présence ou en l'absence d'antioxydants[94], dont la présence peut réduire la perte et par conséquent la décoloration du β -carotène pendant son oxydation couplée à celle de l'acide linoléique dans le système aqueux émulsionné[95].

3.3. Test de FRAP

Cette méthode est basée sur la réduction des ions du complexe ferrique, du Fe^{3+} tripyridyltriazine Fe (TPTZ) $^{3+}$ au $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ bleu foncé dans un milieu acide après l'ajout de l'antioxydant, le changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie à 593nm [96].

3.4. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique

Ce procédé mesure la Malondialdéhyde MDA formé comme produit de scission d'un endoperoxyde des acides gras insaturés résultant de l'oxydation d'un substrat lipidique. Le MDA

est mis à réagir avec l'acide thiobarbiturique pour former un pigment rose, dont l'intensité est mesurée par spectrophotomètre à son maximum d'absorption à 532-535 nm.

3.5. Mesure d'hexanal et des produits finis liés

Ce test se base sur le principe que les produits primaires de l'oxydation des lipides se décomposent pour donner tout un mélange d'époxydes, cétones, hydrocarbures, et aldéhydes saturés et insaturés comme l'hexanal, et la mesure de ces produits finaux est réalisée usuellement par CG/MS[92][97].

3.6. TRAP (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter)

Ce test se base sur la mesure de la consommation d'oxygène au cours d'une réaction d'oxydation des lipides induite régulée par décomposition thermique de 2,2-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride. Les résultats sont exprimés en nombre de millimoles de radicaux peroxyde piégés par 1 litre de plasma. La mesure du TRAP sérum est basée sur la détermination de la durée pendant laquelle le sérum d'un sujet est capable de résister à l'oxydation induite artificiellement suivie en surveillant la consommation d'oxygène dans une cellule d'électrode à oxygène thermostaté lors de l'oxydation du linoléate par les radicaux libres[92].

3.7. Le test de stabilité accélérée

Il est porté sur les lipides comestibles, suite à l'action de la lumière ou le rayonnement UV, ou par exposition à des températures élevées, dont l'impact sur le taux d'oxydation des lipides permet une meilleure analyse en termes d'énergie d'activation globale [98]. Le point final est déterminé par la mesure soit de la conductivité, soit la valeur du peroxyde ou les conjugués diène[92].

3.8. Dosage de Phycoerythrin

Les dérivés des algues rouges : le β -phycoerythrin et le R-phycoerythrin reconnus par leur haute fluorescence, construisent la base de ce test, où ils sont utilisés comme cible des radicaux peroxyde libres générés du 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride et qui les dépourvoit de leur fluorescence en absence de l'antioxydant. Ainsi, pour les radicaux hydroxyles générés de l'ascorbate- Cu^{2+} [99].

VII. Plans d'expérience

1. Introduction

Les progrès de la science ont été fortement liés aux solutions apportées par l'homme à des questions posées par la nature, et à son explication des différents phénomènes observés. En

effet, ces réponses sont principalement basées sur les observations obtenues des expérimentations réalisées, et qui sont basées sur des méthodes rigoureuses. L'expérimentation donc est un outil pour acquérir ou élargir les connaissances, qui doit être optimisée, pour obtenir des résultats fiables avec un minimum d'essai.

Les plans d'expérience (PE) est une des méthodes qualifiées utiles pour la planification des expériences capables de conduire à des conclusions solides, efficaces ainsi que économiques. Le principe des PE consiste à se limiter de réaliser un ensemble de points du domaine étudié, tout en réussissant à appréhender le phénomène physique étudié sur tout le domaine, suivant la norme ISO 3534-3. En résumé, les avantages les plus reconnus des PE sont :

- ✓ l'efficacité : l'adoption d'un minimum d'expériences pour parvenir et prédire les résultats ;
- ✓ l'exactitude : grâce aux tests statistiques utilisés, une haute exactitude est assurée ;
- ✓ les interactions : une bonne compréhension des synergies existantes entre les différents facteurs.

Et grâce aux logiciels des PE, la construction et les calculs sont devenus simples et faciles. Ces outils facilitent aussi les représentations graphiques et améliorent la compréhension des phénomènes. Les principaux logiciels sont : NemrodW, JMP, Minitab, Statistica, Statgraphics, Unscrambler, Pirouette.

2. Notions et terminologie

2.1. Expérience

Une expérience est un moyen systématique et objectif permettant à l'expérimentateur d'obtenir des réponses valables et dépourvues d'ambiguïté aux questions qu'il se pose, en faisant varier des facteurs maîtrisables de manière prédéterminée (ISO 3534-3).

2.2. Facteurs et réponses

On appelle facteur (variable d'entrée) toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée, ou la notion du facteur diffère de celle du variable dans les PE, vu que le facteur doit avoir la possibilité d'être modifié sans difficulté [100]. Les facteurs peuvent être continus en présentant des valeurs numériques, ou bien discrets, et représentés par un nom, une lettre, une propriété ou même par un nombre qui n'a alors en soi aucune valeur numérique mais qu'une signification de repère, ainsi il peuvent être ordonnables qu'on peut

mettre dans un ordre logique, ou facteurs booléens, facteurs discrets qui ne peuvent prendre que deux valeurs : haut ou bas [101].

On appelle réponse Y (variable de sortie) la grandeur qui est observée pour chaque expérience réalisée [100]. Une réponse doit être représentative, quantifiable et la moins dispersée possible pour des variables d'entrée maîtrisées et constante.

2.3. Domaine de variation d'un facteur et Espace expérimentale

Dans les PE, le facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté, et la valeur donnée au facteur pour réaliser un essai est appelée niveau, on limite ses variations entre deux bornes : niveau haut et niveau bas, L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur [102].

La présence d'un second facteur sur un axe gradué et orienté, dont le domaine de variation est déterminé, et qui sera disposé orthogonalement au premier. Aboutira à un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental.

2.4. Domaine expérimental réel ou domaine d'étude

Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental où seront réalisées les expériences. Chaque expérience est représentée par un point expérimental dont les coordonnées correspondent aux niveaux respectifs des facteurs. Une étude, regroupant une série d'expériences, sera donc définie par un ensemble de points répartis dans le domaine d'étude. On distingue :

2.5. Domaine continu

Un domaine expérimental continu est délimité par des facteurs quantitatifs qui déterminent le domaine des expériences possibles, dont le nombre totale qui peut être mis en œuvre est infini. Il est possible de restreindre le domaine expérimental par l'application de contrainte qui peut être due à des expériences impossibles de point de vue technologique ou économique, ou encore à des combinaisons de facteurs improbable figure (5).

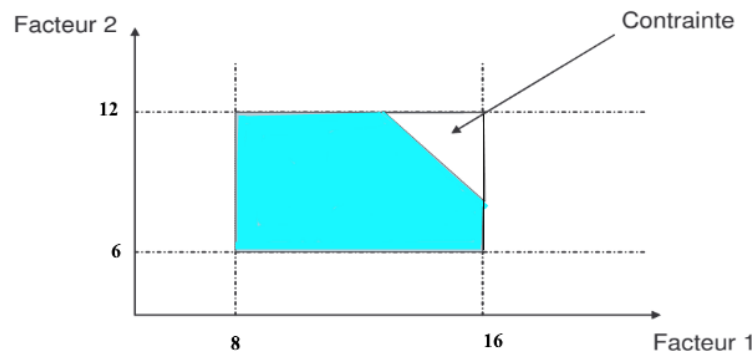


Figure 5: Domaine expérimental continu

2.6. Domaine discret

Le domaine expérimental discret est déterminé par des facteurs discrets ou qualitatifs qui peuvent prendre plusieurs modalités, ce qui limite le nombre d'expériences. Figure (6) présente un domaine discret avec deux facteurs a et b qui prennent 3 modalités, respectivement a1, a2 et a3, b1, b2 et b3, qui donne 9 expériences à réaliser [103].

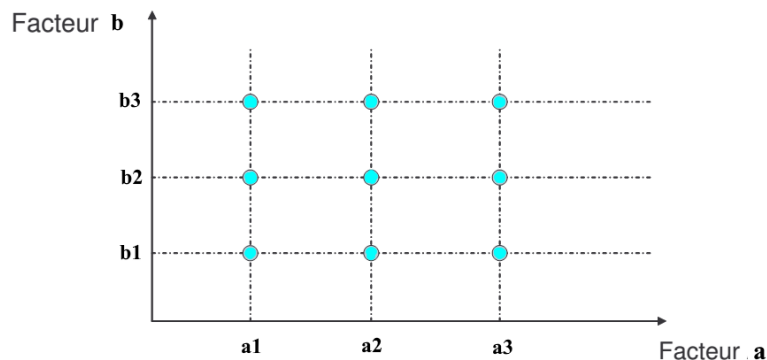


Figure 6 Domaine expérimental discret

2.7. Interaction

L'interaction traduit la notion de l'additivité des effets des facteurs. Il y a interaction entre facteurs lorsqu'ils ne sont pas indépendants c'est-à-dire quand l'effet de l'un est fonction de la combinaison des niveaux des autres.

2.8. Degrés de liberté d'un model

Le degré de liberté résulte de la résolution des systèmes d'équations. En effet pour déterminer p inconnues, il faut p équations, ni plus, ni moins, si on a plus d'équation que d'inconnues, c'est à dire, que si on a n équations avec $n > p$, il reste n-p équations non utilisées, ces équations donne la possibilité ou la liberté de calculer n-p inconnues [104].

2.9. Résidus

Variable aléatoire représentant la différence entre la variable de réponse et sa prédiction sur la base d'un modèle présumé. La valeur prévue de la variable de réponse est fondée sur un modèle présumé, dont les paramètres sont estimés à partir des données. L'erreur résiduelle est la partie de la variable de réponse qui n'est pas expliquée par ces variables de prédiction, qui sont incluses dans le modèle, et peut être due à des causes fortuites ou systématiques.

Le résidu est donc la différence entre la valeur mesurée et la valeur calculée par le modèle :

$$r = y - \bar{y} \quad Eq: 4$$

2.10. Fonction de désirabilité

La fonction désirabilité est le meilleur compromis entre plusieurs réponses. Cette fonction a été proposée par Derringer et Suich et elle figure dans de nombreux logiciels de plans d'expériences. Elle est très facile à utiliser et rend de grands services [101]. Elle facilite l'interprétation des résultats et les rend comparables.

2.11. Notion de modélisation mathématique

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé [102]:

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_i^2 + a_{ij\dots z} X_i X_j \dots X_z \quad Eq: 5$$

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).
- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences

2.12. Plan de mélange

2.12.1. Contrainte fondamentale des mélanges

Dans les plans d'expériences classiques les facteurs sont indépendants, ce qui est différent dans le cas des mélanges, car, en général, on étudie les réponses en fonction des proportions des constituants du mélange ; donc il faut bien se rendre compte qu'il y a un plan de mélanges lorsque la réponse étudiée dépend des proportions des constituants du mélange et non des quantités de mélange utilisées.

Cette non-indépendance des facteurs est exprimée par la contrainte fondamentale des mélanges où la somme des proportions est toujours égale à 100 %. Si on note x_i la teneur en constituant i , la somme des teneurs de tous les constituants du mélange satisfait la relation [104]:

$$\sum_{i=1}^{i=n} X_i = 100 \% \quad \text{Eq: 6}$$

D'où la teneur en chaque constituant reste comprise entre 0 et 100 %.

2.12.2. Représentation géométrique des mélanges

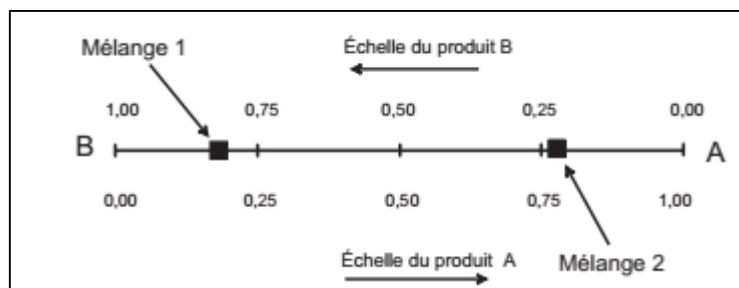
2.12.2.1. Mélange à deux

Soit x_1 la teneur en constituant A et x_2 la teneur en constituant B. représentés respectivement sur le repère cartésien (Ox_1, Ox_2) , où les axes sont gradués de 0 à 1. La représentation géométrique d'un mélange quelconque contenant x_a de A et x_b de B est représenté par le point situé à l'intersection des coordonnées X_a et X_b (figure 8).

Avec

$$X_a + X_b = 1$$

Eq: 7



**Figure 7: Schéma illustre Le mélange 1 qui contient 20 % de A et 80 % de B.
Le mélange 2 contient 77 % de A et 23 % de B [101]**

Cette relation indique que les points de coordonnées X_a et X_b sont sur une droite de pente -1, coupant l'axe du produit A au point d'abscisse 1,00 et l'axe du produit B au point d'ordonnée

1,00 et les compositions X_a et X_b variant entre 0 et 1. Toutes les compositions possibles des mélanges des deux produits A et B sont représentées par les points de segment de droite AB.

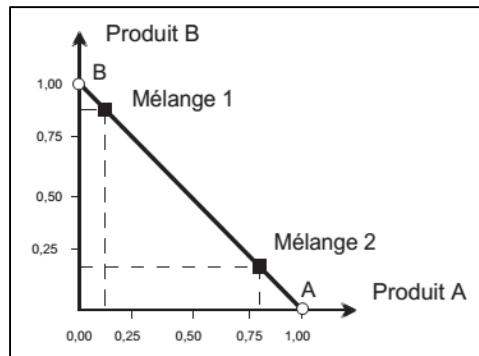


Figure 8: Compositions des mélanges à deux constituants représentées par les points du segment de droite AB [101]

2.12.2.2. Mélange à trois

Les mélanges ternaires se présentent géométriquement sous forme d'un triangle équilatéral. Les produits purs sont aux sommets du triangle. Les mélanges binaires sont représentés par les côtés du triangle, le côté AB du triangle représente les compositions des mélanges des seuls produits A et B ; et ces mélanges ne contiennent pas de produit C. Et chaque côté du triangle est gradué de 0 à 1.

Un point de la surface intérieure du triangle représente un mélange ternaire. Et la composition de chaque produit se lit sur les côtés du triangle. La teneur en produit A se lit sur le côté AB qui est l'échelle du produit A. On projette le point M sur AB parallèlement à BC (côté opposé à A), et de même pour les teneurs des autres produits B et C [101].

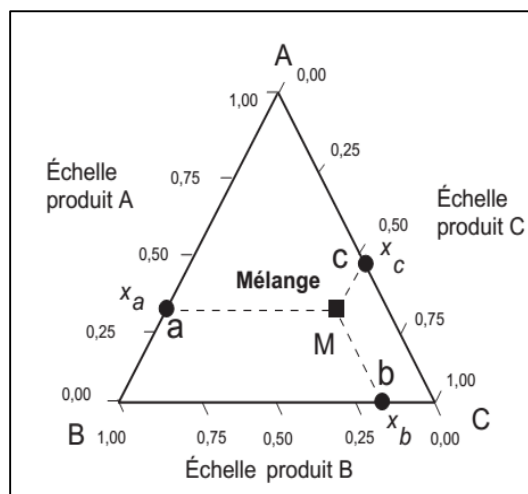


Figure 9: Représentation des mélanges à trois constituants à l'aide d'un triangle équilatéral [101]

2.12.2.3. Modèles mathématiques des mélanges

La modélisation mathématique des mélanges est fortement liée à la contrainte fondamentale des mélanges. D'abord, considérons que les variations de la réponse sont proportionnelles aux compositions du mélange. On pourrait adopter, en premier lieu, le même modèle que celui des plans factoriels classiques dont les facteurs sont indépendants :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 \quad \text{Eq: 8}$$

Hors, les compositions x_i ne sont pas indépendantes. Et la contrainte fondamentale des mélanges dit que :

$$X_1 + X_2 + X_3 = 1 \quad \text{Eq: 9}$$

D'où l'écriture suivante est valable :

$$Y = a_0(X_1 + X_2 + X_3) + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 \quad \text{Eq: 10}$$

Où en regroupant les coefficients :

$$Y = (a_0+a_1)X_1 + (a_0 + a_2)X_2 + (a_0 + a_3)X_3 \quad \text{Eq: 11}$$

Le modèle ne comportera alors plus de terme constant si on change de notation :

$$b_1 = (a_0+a_1)$$

$$b_2 = (a_0+a_2)$$

$$b_3 = (a_0+a_3)$$

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 \quad \text{Eq: 12}$$

Donc pour un mélange à trois composants, le modèle du premier degré en un point donné est :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$$

Du second degré :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad \text{Eq: 13}$$

Avec

parfois on est amené à utiliser des modèles de degré supérieur, trois et même parfois quatre si les surfaces de réponses sont compliquées.

Le modèle mathématique du troisième degré, peut s'obtenir à partir d'un polynôme du troisième degré. Le modèle, appelé modèle «cubique complet», est le suivant :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b'_{12}X_1X_2(X_1 - X_2) + b'_{13}X_1X_3(X_1 - X_3) + b'_{23}X_2X_3(X_2 - X_3) + b'_{123}X_1X_2X_3 \quad Eq: 14$$

Le modèle simplifié, appelé «modèle cubique restreint», correspondant à un mélange de trois constituants est le suivant :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad Eq 15$$

2.12.2.4. Analyse globale des résultats

a- Analyse mathématique

L'analyse mathématique réalisée souvent par les logiciels ne se base que sur le principe de la RLM, qui vise d'expliquer une variable aléatoire quantitative Y en fonction de p variables explicatifs X_1, X_2, \dots, X_p .

Soit un échantillon de n observations $\{y_i\}_i^n$ variant en fonction de p variables indépendantes (X_1, X_2, \dots, X_p). Le modèle de la RLM s'écrit :

$$Y_i = b_0 + b_iX_i + b_jX_j + \dots + b_{ij}X_iX_j + e_i \quad Eq: 16$$

Où b_i est le terme de l'effet principal, b_{ij} le terme de l'effet d'interaction et e_i l'erreur vérifiant les hypothèses suivantes :

- $E(e_i) = 0$
- $V(e_i) = \sigma^2$
- $Cov(e_i, e_j) = 0$ si $i \neq j$

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & X_{21} & X_{31} & \dots & X_{1p} \\ 1 & X_{21} & X_{22} & X_{32} & \dots & X_{2p} \\ 1 & X_{31} & X_{32} & X_{33} & \dots & X_{3p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & X_{n1} & X_{n2} & X_{n3} & \dots & X_{np} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ \vdots \\ b_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ \vdots \\ e_n \end{bmatrix}$$

D'où

$$Y = bX + e \quad Eq: 17$$

b- Calcul des coefficients

La résolution de l'Eq 17, basé sur la régression multilinéaire associée au critère des moindres carrés qui mène à minimiser la somme des carrés des écarts, permet de calculer des coefficients \hat{b} suivant la relation suivante [103]:

$$\hat{b} = (X^t X)^{-1} \cdot X^t Y \quad \text{Eq: 18}$$

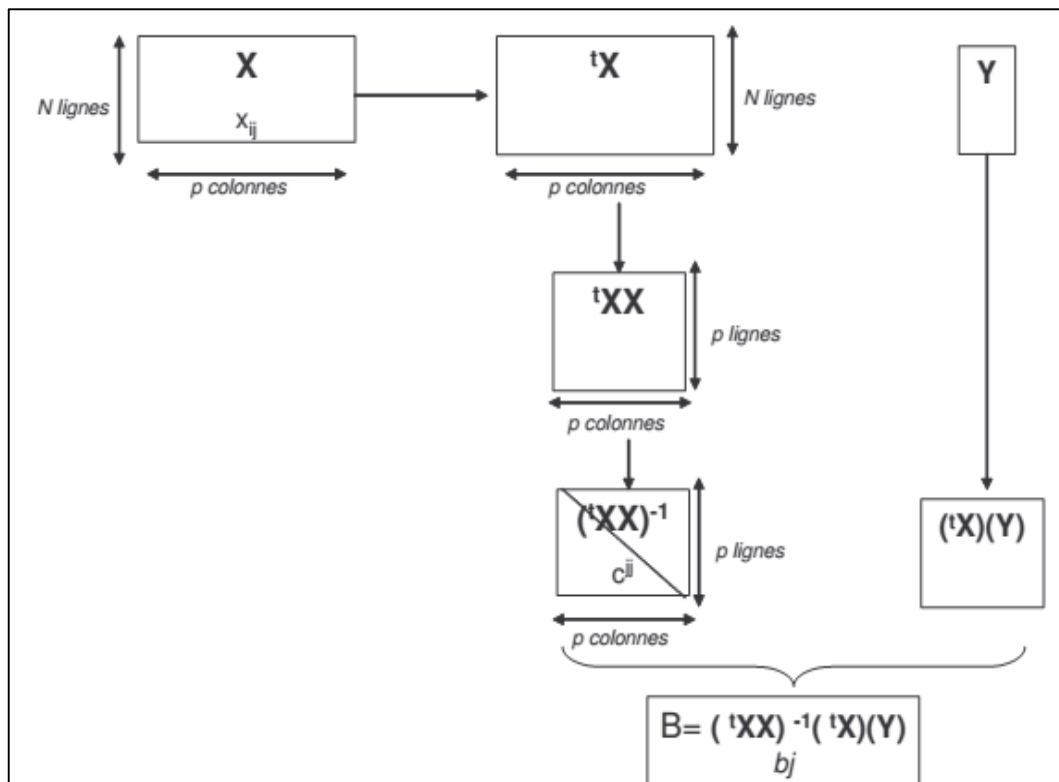


Figure 10 : Etapes mathématiques aboutissant au calcul des coefficients[103]

c- Analyse statistique

L'évaluation globale du modèle étudié se base sur la fondation de plusieurs hypothèses à respecter, dont les principales sont[104] :

- Les erreurs expérimentales sont des variables aléatoires provenant de la même Population pour tout le domaine d'étude, distribuées normalement avec une espérance mathématique nul ;
- Le modèle choisi est proche de celui qui représente le phénomène étudié ;
- La réponse est la somme d'un modèle mathématique qui n'introduit pas d'erreur (résidu = erreur expérimentale + erreur d'ajustement) ;

- Les résidus doivent pouvoir être considérés comme des variables aléatoires ;
- Les résidus doivent être distribués normalement, statistiquement indépendants, et aucune corrélation ne les assemble.

En se basant sur les hypothèses précédentes, l'évaluation de la qualité descriptive et prédictive du modèle est assurée par plusieurs tests statistiques[104] [103].

Les indices statistiques les plus importants sont :

- i. Le coefficient de détermination R^2 et R^2 ajusté (Qualité descriptive)

C'est un quotient qui permet de se rendre compte si le modèle de régression choisi passe globalement près des points représentatifs des réponses mesurées :

$$R^2 = \frac{SCRCm}{SCRMm} = \frac{\hat{y}^t \hat{y} - \bar{y}^t \bar{y}}{y^t y - \bar{y}^t \bar{y}} \quad Eq: 19$$

Le R^2 ajusté

$$R_A^2 = 1 - \frac{V(SCE)}{V(SCRMm)} = 1 - \left(\frac{\hat{e}^t \hat{e}}{y^t y - \bar{y}^t \bar{y}} \right) \frac{n-1}{n-p} \quad Eq: 20$$

$\hat{y}^t \hat{y}$: La somme des carrés des réponses calculées ;

$\hat{e}^t \hat{e}$: La somme des carrés des résidus estimés avec l'hypothèse des moindres carrés ;

$\bar{y}^t \bar{y}$: La somme des carrées due à la moyenne.

- ii. Analyse de la variance

L'analyse de la variance permet la confirmation de la justesse du modèle en ce qui concerne la prédiction et l'explication des variations observées de Y_i .

Dans le cadre de la régression multilinéaire et de l'hypothèse des moindres carrées, la somme des carrées des réponses mesurées $y^t y$, se décompose en deux somme :

$$y^t y = \hat{y}^t \hat{y} + \hat{e}^t \hat{e} \quad Eq: 21$$

$$SCM = \bar{y}^t \bar{y} \quad Eq: 22$$

$$SCRCm = y^t y - \bar{y}^t \bar{y} \quad Eq: 23$$

$$SCRMm = \hat{y}^t \hat{y} - \bar{y}^t \bar{y} \quad Eq: 24$$

L'analyse de la variance introduit les quantités SCRMm et SCRCm :

$$SCRMm = SCRM - SCM \quad Eq 25$$

$$SCRCm = SCRC - SCM \quad Eq: 26$$

$$SCRM - SCM = SCRC - SCM + SCE \quad Eq: 27$$

$$SCRMm = SCRCm + SCE \quad Eq: 28$$

Ces sommes de carrés sont mises à profit pour construire les tableaux des sommes de carrés et de l'analyse des variances. Ces tableaux permettant d'établir des indices statistiques qui mesurent la qualité de la modélisation des réponses mesurées.

Tableau 3: Présentation générale d'un tableau d'analyse de la variance adapté pour une régression multiple

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	Rapport F
Régression	SCRCm	p-1	SCRCm/p-1	(SCRCm/p-1)/ (SCE/n-p)
Résidus	SCE	n-p	SCE/n-p	
Total	SCRMm	n-1		

Le F de Fisher indique la probabilité que tous les coefficients ne soient pas nuls :

$$F = \frac{SCRCm}{SCE} \left(\frac{n-p}{p-1} \right) = \frac{\hat{y}^t \hat{y} - \bar{y}^t \bar{y}}{\hat{e}^t \hat{e}} \left(\frac{n-p}{p-1} \right) \quad Eq: 29$$

Si le F de Fisher est élevé, la variance de la régression (réponses calculées) est plus grande que la variance des résidus. La probabilité que les coefficients du modèle soient nuls est alors très faible, c'est-à-dire un F de Fisher très élevé et probabilité (p-value) faible.

VIII. Les plantes étudiées :

1. *Origanum majorana* :

Plante aromatique Sous-arbrisseau vivace, touffu ; pubescent, atteignant 40cm de hauteur, à tiges quadrangulaires dressées. Les feuilles sont petites, ovales, tomenteuses, vert-blanchâtres. Les fleurs, blanches ou rosées, sont groupées par trois à l'aisselle de bractées serrées en

coquilles, et forment des panicules terminales d'épis globuleux. Le fruit est formé de 4 akènes lisses. Toute la plante dégage une odeur aromatique suave[105].

2. *Origanum compactum*

Plantes herbacées ou sous-ligneuses à la base, à tiges quadrangulaires, généralement dressées. Les feuilles sont opposées, Les fleurs, à corolle rose ou blanche, à calice tubuleux, avec 4 étamines divergentes vers le haut, sont groupées en épis généralement denses, à bractées amples et imbriquées, eux-mêmes réunis en inflorescences composées[105].

3. *Thymus serpyllum*

Plante vivace de 5-30 cm, verte, glabrescente ou peu velue, aromatique ; souche peu épaisse, émettant de longues tiges couchées-radicantes, formant un gazon assez serré ; rameaux assez allongés, brièvement pubescents tout autour ; feuilles petites, obovales en coin ou linéaires-oblongues (4-6 mm de long), atténuées et longuement ciliées à la base, glabres sur les faces, à nervures saillantes ; inflorescence en têtes globuleuses ou ovoïdes ; calice poilu tout autour ou glabre en dessus [106].

4. *Mentha spicata*

Plantes vivaces, stolonifères, à tiges quadrangulaires, à feuilles d'un beau vert, sessiles, ovales-lancéolées, dentées sur les bords, à surface très souvent ridée. Les inflorescences sont des épis allongés de fleurs blanches ou pourpres. Toute la plante dégage au froissement, une odeur aromatique caractéristique. C'est une plante très cultivée partout au Maghreb, dans les jardins et dans les zones maraichères [105].

5. *Myrtus communis*

Arbuste touffu de 1 à 3m de hauteur, à tiges rameuses. Les feuilles sont opposées, persistantes, coriaces, luisantes, de couleur vert foncé, ovales, aiguës au sommet et parsemées, de petites glandes sécrétrices visibles par transparence. Les fleurs sont grandes, blanches, pédonculées. Le fruit est une baie ovoïde, charnue, de 6 à 8mm, noir-bleuâtre à maturité, surmontée de 5 dents persistantes du calice, rappelant vaguement un clou de girofle[105].

6. *Artemisia herba-alba*

Plante dressée, vivace, sous-frutescente, de 10 à 50cm de hauteur, à tiges nombreuses, tomenteuses portant des feuilles courtes, pennatifides, généralement pubescentes, de couleur gris argenté. Les inflorescences sont des capitules homogames de petites fleurs peu

nombreuses, jaunâtres, à involucre scarieux, hermaphrodites. Les fruits sont des akènes oblongs, chauves et lisses. Toute la plante exhale une forte odeur camphrée[105].

7. *Citrus aurantium*

Petit arbre de 3 à 5 m de haut, à tronc ramifié et à branches épineuses. Les feuilles sont vertes, luisantes, à pétiole largement aillé. Les fleurs, apparaissant en mai-juin, sont blanches, et très odorantes et groupées par 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles. Les fruits sont semblables à des oranges mais plus petits[105].

8. *Lavendula dentata*

Arbuste vivace, atteint jusqu'à 1 m de hauteur et de largeur, avec des branches droites et ligneuses à la base. Feuilles sessiles, étroites, linéaires, épais. Les fleurs apparaissent en grappes serrées dans une pointe en haut de mince, bleu-violet, bractées papyracées et petit, pâle bleu-violet. La pointe est surmontée d'une touffe de grandes bractées stériles, voyantes qui sont la partie la plus remarquable de l'inflorescence[107].

9. *Pelargonium asperum*

un arbrisseau ligneux qui se présente en grosse touffe arrondie et peut atteindre jusqu'à 1 mètre de hauteur et 1 m de diamètres au niveau de la cime. Les feuilles, molles, sont lobées et cordiformes dégageant une odeur de rose. Les fleurs sont irrégulières, de couleur rose violet, formant une pseudo-ombelle compacte. Les deux pétales postérieurs sont plus larges que les 3 antérieurs.[108]



Partie II : Contribution à la valorisation des plantes médicinales et aromatiques marocaines

Chapitre I : Extraction des huiles essentielles, rendements, et compositions chimiques

I- Introduction

Les HEs sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations différentes. Elles sont caractérisés par deux ou trois composants principaux à des concentrations assez élevées (20-70%) par rapport à d'autres composants présents sous forme de traces[17]. Ces molécules et leurs proportions constituent l'identité propre à chaque huile. En effet, la chimie des HEs soutient leurs activités biologiques. Elle nous permet de les classer suivant les familles chimiques, les propriétés thérapeutiques et les contre-indications. La détermination de la composition chimique des HEs constituera donc une étape fondamentale pour la bonne valorisation de ces huiles et surtout pour se garantir le meilleur résultat en fonction de ce qu'on attend d'elles.

II- Matériel et méthodes :

1. Matériel végétale

Le tableau (4) rassemble les noms des plantes de la région de Taounate étudiées, leurs familles, leurs parties extraites, ainsi que leurs périodes de récolte.

Tableau 4: Plantes étudiées, origines, parties utilisées et périodes de récolte

Plante	Nom français	Nom vernaculaire	Famille	Partie utilisée	Période de récolte	Plante cultivée/Sauvage
<i>O. compactum</i>	Origan	Zaâtar	Lamiaceae	Aérienne	Juillet	Sauvage
<i>O. majorana</i>	Marjolaine	Mardedouche	Lamiaceae	Aérienne	Août	Cultivée
<i>T. serpyllum</i>	Serpolet	Zâitra	Lamiaceae	Aérienne	Août	Sauvage
<i>P. asperum</i>	Géranium	Aâtrcha	Geraniaceae	Aérienne	Mai	Cultivée
<i>O. mixta</i>	Ormenie	Elhallala	Asteraceae	Aérienne	Juillet	Sauvage
<i>L. dentata</i>	Lavande blanche	Lkhzama lbdia	Lamiaceae	Aérienne	Septembre	Sauvage
<i>M. spicata</i>	Menthe	Naânaâ	Lamiaceae	Aérienne	Août	Cultivée
<i>C. aurantium</i>	Bigaradier	Ranje	Rutaceae	Feuille-zest	Janvier	Cultivée
<i>M. communis</i>	Myrte	Rihane	Myrtaceae	Aérienne	Août	Sauvage
<i>A. Herba-alba</i>	Armoise	Chih	Asteraceae	Aérienne	Juillet	Sauvage

2. Extraction des huiles essentielles et calcul des rendements

L'extraction des HEs a été réalisée à l'aide d'un appareil Clevenger. Une masse de 100g de chaque plante a été émergée dans l'eau dans un ballon de 1L, après l'ajout de quelques grains de pierre ponce, le tout est porté à ébullition pendant une durée de 3 heures à une température modérée, les vapeurs chargées de substances volatiles se condensent en traversant le réfrigérant. Les deux liquides de densités différentes sont ensuite séparés par simple décantation. En fin, les huiles obtenues se conservent à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'à utilisation.

Le rendement en HE est le rapport entre le volume d'HE extrait, et le poids de la biomasse végétale sèche. Il est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R = \frac{V_{HE}}{P_V} * 100$$

R : Rendement en HE.

V_{HE} : Volume de l'HE en millilitre.

P_V : Poids de la biomasse végétale sèche en gramme.

3. Détermination de la composition chimique : Chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse

Les HEs ont été analysées par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Trace GC ULTRA, équipé d'un injecteur en mode Split, d'une colonne DB-5 (Longueur : 30 m, Diamètre interne : 0.25 mm, Epaisseur du film : 0.25 μ m). Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur: hélium, solvant : Acétate d'éthyle température d'injection 220 C°, volume d'injection 1 μ l, débit 1,4 ml/min, programmation de température: de 40 à 180°C à 4°C/mn, avec un palier de 20 min à 300°C. Le couplage avec le spectromètre de masse Polaris Q MS ce fait avec une température d'interface de 300 C°. Les conditions opératoires sont les suivantes : Type d'ionisation EI (70 eV), Température de la source d'ionisation 200°C, détecteur Trappe ionique. La base de données utilisée : NIST MS Search. L'identification des composés dans chaque HE est basée sur :

- La comparaison de leurs indices de rétention (IR) sur les colonnes apolaires et polaires, déterminés par rapport aux indices de rétention d'une gamme étalon d'alcane ; avec ceux des composés de références ;
- La comparaison de leurs spectres de masse avec les spectres de la base de données NIST;
- Comparaison avec la base de données Adams.

III- Résultats et discussion : Rendement et compositions chimiques des huiles essentielles

Le tableau (5) rassemble les rendements obtenus pour les HEs des plantes étudiées, la couleur et l'odeur dégagée de chaque HE étudiée.

Tableau 5: Rendements en HE des plantes étudiées

Plante	Rendement (%)	Couleur	Odeur
<i>O. compactum</i>	1,1	Jaune-verdâtre clair	Aromatique forte
<i>O. majorana</i>	1,2	transparent	Aromatique
<i>T. serpyllum</i>	0,9	Jaune	Aromatique forte
<i>P. asperum</i>	0,4	Vert clair	Citronné
<i>O. mixta</i>	0,7	Vert clair	Aromatique douce
<i>L. dentata</i>	1,1	Jaune	Aromatique
<i>M. spicata</i>	0,7	Vert clair	Menthe
<i>M. communis</i>	0,5	Marron orangé	Aromatique épicée
<i>A. herba-alba</i>	1	Jaune foncé	Aromatique douce
<i>C. aurantium feuilles</i>	0,8	Vert clair	Aromatique florale
<i>C. aurantium Zest</i>	1,85	Jaune-orangé	Citronné acidulée

1. *Origanum compactum*

L'hydrodistillation de la partie aérienne d'*O. compactum* a révélé un rendement de 1,1%, donné qui rejoint les normes marocaines donnant un intervalle des rendements limité entre 0,31 et 2,88% [109][110]. Aboukhalid et son équipe, étudiant le rendement de l'*O. compactum* du Maroc suivant les régions, a observé que les espèces des régions arides tendent à produire un rendement considérable par rapport aux régions humides, en expliquant cela comme étant un mécanisme d'adaptation au stress hydrique [111].

L'analyse de la composition chimique de la partie aérienne de l'HE d'*O. compactum* a révélé vingt-quatre composés représentant une aire cumulée qui correspond à 99,65% des aires cumulées de l'ensemble des constituants (Tableau 6). Les monoterpènes oxygénés ont présenté 65,87% des composés identifiés, les monoterpènes hydrocarbonés ont présenté 32,1% , cependant que les sesquiterpènes hydrocarbonés n'ont pas dépassé 1,44% représenté par le caryophyllène.

Une prédominance en carvacrol (47.80 %), γ -terpinène (17.25 %) et thymol (15.74 %) a été observée, rendant le profil comparable à ceux trouvés par d'autres études, citant le thymol, le carvacrol et le γ -terpinène comme composés majoritaires[112], [113]. Cependant que le carvacrol, le thymol, ont prédominé avec le p-cymène dans d'autres études menées sur l'HE

d'*origanum compactum* [114], [115]. En dehors de tout cela, la biosynthèse du thymol et du carvacrol dans plusieurs plantes, a été rapporté à la présence de deux précurseurs qui sont le p-cymène et γ -terpinène [116], [117], en expliquant la présence mutuelle des quatre composés. Généralement, leurs concentrations dans l'HE d'origan peut être affectée par les conditions climatiques, les zones géographiques et la saison de la collecte des plantes, mais leur somme reste à peu près égale.

Tableau 6: Composition chimique de l'HE d'*O. compactum*

Composés	Air %	IR	TR	Mode d'identification	Références
Carvacrol	47,85	1301	18,88	1,2	[114]
γ-terpinène	17,25	1056	9,3	1,2	[114]
Thymol	15,75	1292	18,48	1,2	[114]
p-cymène	8,44	1023	8,14	1,2	[114]
α -terpinène	2,19	1016	7,87	1,2	[114]
Caryophyllène	1,44	1415	24,05	1,2	
β -myrcène	1,42	987	6,95	1,2	[114]
Linalool	1,36	1099	10,85	1,2	[114]
Sabinène	1,06	924	5,28	1,2	[114]
1R- α -pinène	0,61	932	5,48	1,2	[114]
(-) - terpinèn-4-ol	0,43	1180	14,12	1,2	[114]
D-limonène	0,25	1028	8,28	1,2	[114]
α -phellandréne	0,24	1007	7,53	1,2	[114]
β -pinène	0,21	977	6,68	1,2	[114]
β -thujène	0,21	1029	8,35	1,2	
α -terpineol	0,16	1195	14,74	1,2	[114]
Borneol	0,15	1171	13,78	1,2	[114]
2-carene	0,12	1084	10,28	1,2	
Camphène	0,09	948	5,92	1,2	
3-octanone	0,09	982	6,82	1,2	
p-cymenène	0,08	1089	10,48	1,2	
Myrténol	0,08	1197	14,84	1,2	[114]
(+) - 3-carene	0,07	1009	7,6	1,2	
β -cis-ocimène	0,06	1043	8,84	1,2	
monoterpènes oxygénés	65,87				
monoterpènes hydrocarbonnés	32,01				
Sesquiterpène hydrocarbonnés	1,44				
Sesquiterpène oxygénés	0				
Autres	0,09				
Totale	99,65				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

2. *Origanum majorana*

Concernant l'hydrodistillation de la partie aérienne de l'*O. majorana*, un rendement de 1,2% a été obtenu. Un rendement similaire à celui de Busatta et ses collaborateurs étudiant la marjolaine égyptienne[118], ainsi à celui obtenu de la marjolaine grecque équivaux à 1,01%. En revanche, le plus haut rendement obtenu pour la marjolaine a été observé pendant la recherche consacrée pour l'étude de la marjolaine turque récoltée en stade de maturité

enregistrant un rendement de 2,8% [119]. Cependant le plus faible est observé chez celle récolté pendant la période de floraison, avec un rendement qui varie entre 0,04 et 0,2% [120] [121].

L'analyse de la partie aérienne de l'*O. majorana* a révélé vingt et un composés représentant 95,72% de la totalité des airs cumulés (Tableau 6). Les composés majoritaires de l'HE de la marjolaine sont : (-)- terpine-4-ol (29.10 %), trans-4-thujanol (24.57 %) et p-cymène (12.64). Les dérivés terpéniques réparent 93,42 de monoterpènes et 2,3% de sesquiterpènes, où les monoterpènes hydrocarbonés présentent 16,87%, contre 76,55% de ceux oxygénés, tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés sont représenté par le caryophyllène à 0.4% contre 1,9% de sesquiterpènes oxygénés.

Les résultats obtenus pour la marjolaine semblent en accord avec ceux déjà réalisés, contenant majoritairement le terpinèn-4-ol [120], [122]–[125]. Cependant, divers travaux sur la composition chimique des HEs d'*O. majorana* ont trouvé d'autre majoritaire comme le 4-thujanol (l'hydrate de sabinène) [71], le linalool[123], et le carvacrol [119].

Les variations importantes de composition citée dans la bibliographie concernant cette HE (pratiquement de 0 à 40 % pour l'hydrate de sabinène et/ou le terpin-1-èn-4-ol), peuvent être expliquées par l'expérience conduite par Wallach avec le cis-hydrate de sabinène et son acétate synthétique. Où il a montré que son simple reflux dans l'eau, à pH légèrement acide, le décompose : en 30 minutes, et il ne reste que 10 % de l'acétate et 85% de l'alcool alors qu'apparaissent le terpin-1-èn-4-ol (majoritaire), le γ -terpinène, l' α -terpinène, le para-cymène, le limonène, le terpinolène et l' α -terpinéol (Figure 11). L'exemple de l'HE de marjolaine confirme l'instabilité des dérivés hydroxylés du sabinène et corrobore l'exemple de *Melaleuca alternifolia* [126]–[128].

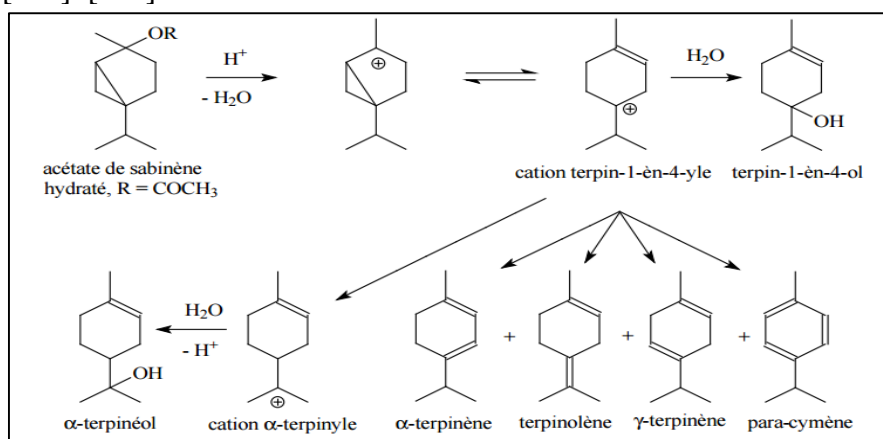


Figure 11: Dégradation d'acétate de sabinène pendant l'hydrodistillation

Tableau 7: Composition chimique de l'HE d'*O majorana*

Composés	Air %	IR	TR	Mode d'identification	Références
(-) - terpinèn-4-ol	29,11	1180	14,12	1,2	[129]
Z-4-thujanol	24,57	1101	10,93	1,2	[129]
p-cymène	12,64	1023	8,14	1,2	[129]
α -terpinéol	9,05	1195	14,74	1,2	[120]
E- β terpinéol	5,45	1069	9,75	1,2	[129]
Z-2-menthénol	2,16	1124	11,84	1,2	
β -Phellandrène	2,14	971	6,52	1,2	
Z-acétate de sabinène hydrate	1,71	1252	17,19	1,2	[129] [120]
E-acétate de sabinène hydrate	1,48	1248	17	1,2	[129] [120]
E-menth-2-en-1-ol	1,27	1141	12,56	1,2	[129]
Caryophyllene oxide	1,08	1576	30,48	1,2	[129]
1,8 cinéole	1,05	1031	8,39	1,2	[120]
D-limonène	0,98	1028	8,28	1,2	
Spathulenol	0,82	1572	30,32	1,2	
ρ -cymèn-8-ol	0,59	1186	14,41	1,2	
β -myrcène	0,4	987	6,95	1,2	[129]
Caryophyllène	0,4	1415	24,05	1,2	[120]
1R- α -pinène	0,35	932	5,48	1,2	[129] [120]
β -pinène	0,19	977	6,68	1,2	[129] [120]
Sabinène	0,17	924	5,28	1,2	[120]
Verbénone	0,11	1203	15,11	1,2	[120]
Monoterpènes hydrocarbonés	16,87				
Monoterpènes oxygénés	76,55				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,4				
Sesquiterpene oxygénés	1,9				
Total	95,72				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

3. *Thymus serpyllum*

L'hydrodistillation du serpolet marocain a révélé un rendement de 0,9%. Ce rendement corrobore avec celui du *T. serpyllum* d'Iran pendant sa période de pleine floraison[130][131], alors qu'il ne dépasse pas 0,57% avant la floraison. Le rendement du serpolet de la Jordanie s'est balancé entre 2,5 et 5,4%, l'auteur a lié ses variations à la région de récolte, au climat et aux différences géographiques[132]. Cependant le serpolet du Pakistan, de la Lituanie, de la Pologne n'ont enregistré respectivement que un rendement de 0,48% ; 0,12-0,27% et 0,21-0,6%.

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *T. serpyllum* a permis d'identifier trente-six composés représentant 99,61% (Tableau8).

Parmi les composés terpéniques identifiés on note 96,08% de monoterpènes contre juste 3,53% de sesquiterpènes. La fraction monoterpénique est représentée par les monoterpènes hydrocarbonés représentant la classe majoritaire avec un taux de 67,21%, et par les monoterpènes oxygénés représentant 28,87%. Cependant que les sesquiterpènes ont été représentés juste par ceux hydrocarbonés avec un taux de 3,53%.

Tableau 8: Composition chimique de l'HE du *T. serpyllum*

Composés	Air%	TR	IR	Mode d'identification	Références
p-cymène	36,16	8,14	1023	1,2	[136]
γ -terpinène	18,31	9,3	1056	1,2	[136]
Thymol	17,29	18,48	1292	1,2	
Linalool	4,51	10,85	1099	1,2	[136]
Caryophyllène	3,13	24,05	1415	1,2	
Methyl de thymol	3,02	16,15	1237	1,2	
α -terpinène	2,61	7,87	1016	1,2	
D-limonène	2,2	8,28	1028	1,2	
β -myrcène	1,88	6,95	987	1,2	
Sabinène	1,75	5,28	924	1,2	[136]
1R- α -pinène	1,55	5,48	932	1,2	
Camphène	0,66	5,92	948	1,2	
β -pinène	0,62	6,68	977	1,2	[136]
Bornéol	0,59	13,78	1171	1,2	[136]
(-) - terpinèn-4-ol	0,54	14,12	1180	1,2	[136]
(-) - camphor	0,39	12,74	1146	1,2	
β -thujène	0,37	8,35	1029	1,2	
α -phellandrène	0,34	7,53	1007	1,2	
β -Farnesene	0,28	30,48	1576	1,2	
Terpinolène	0,25	10,29	1084	1,2	
p-cymenène	0,22	10,48	1089	1,2	
1,8 cinéole	0,18	8,39	1031	1,2	[136]
α -terpinéol	0,15	14,74	1195	1,2	[136]
(+)-4-carène	0,13	9,75	1069	1,2	
3-octanone	0,11	6,82	982	1,2	
(+) - 3-carène	0,1	7,6	1009	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	65,4				
Monoterpènes oxygénés	28,87				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	3,533				
Sesquiterpene oxygénés	0				
Autres	0,09				
Totale	97,89				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-51: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

Trois monoterpènes que sont P-cymene (36.15 %), γ -terpinene (18.31 %) et thymol (17.29 %), ont été identifiés comme composés majoritaires. Ces résultats corroborent avec plusieurs études menées sur surtout pour γ -terpinène et thymol [130], alors qu'ils contredisent d'autres études rapportant le carvacrol et le thymol comme composés majoritaires [133], [134]. Cette divergence entre les compositions chimiques étudiées a pu être expliquée par la variabilité de saisons, influençant le profil de l'HE, en favorisant la biosynthèse du p-cymene et du γ -Terpinene en hiver et en printemps, et le thymol en automne [135].

4. *Lavandula dentata*

Le rendement de 1,1% de l'HE, obtenu par l'hydrodistillation de la partie aérienne de *L. dentata*, reste plus important que celui trouvé par Chebli *et al* (0,7%) [114] sans pour autant dépasser celui obtenu par distillation à la vapeur de la lavande blanche du Brésil [136].

A noter que le rendement peut varier en fonction de la région et selon la récolte. C'est le cas de l'HE en Algérie dont le rendement oscille entre 0,24 et 1,34% [137].

L'analyse de l'HE de la partie aérienne de *L. dentata* a permis d'identifier cinquante-six composés représentant 98,9% de l'huile totale (Tableau 9).

La composition terpénique est constituée majoritairement des monoterpènes représentée par 37,87% de monoterpènes hydrocarbonés, et 50,11% de monoterpènes oxygénés, cependant que les sesquiterpènes ne représentent que 2,56% de ceux oxygénés et 0,96% de ceux hydrocarbonés. Alors que les autres terpénoïdes représentent 7,49%.

Quatre monoterpènes majoritaires ont été identifiés : β -pinène (25.82%), 1,8-cineole (10.82%), fenchone (9,8%) et α -pinène (8.6%) formant 55,04% de l'huile totale. Les différentes études portées sur l'HE du *L. dentata*, ont repéré le 1,8 cineol comme majoritaire, [138], [139], ce qui contredit nos résultats nommant le β -pinène. Cependant, l'étude de Bousmaha *et ses collaborateurs*, étudiant plusieurs échantillons provenant de différentes régions d'Algérie, a lié cette divergence à la région de récolte favorisant la biosynthèse intense d'un des deux terpènes, 1,8 cineol, ou β -pinène [137]. Autres études marocaines ont révélé d'autres compositions chimiques, riches en acétate de linalyl et en linalool [114]. Par ailleurs, l'étude de la composition chimique de l'HE du *L. dentata* a pu prendre une autre dimension, en étudiant l'effet de différentes hormones sur la biosynthèse du composé majoritaire, en effet, une considérable variation a été observée en changeant les milieux de culture de la plante, dont les différents composés identifiés sont 1,8-cineole, fenchol, bornéol et camphre [140].

Tableau 9: Composition chimique de l'HE de *L. dentata*

Composés	air %	TR	IR	Mode d'identification	Références
β-Pinene	25,8	6,7	977	1,2	[137] [139]
1,8-Cineole	10,8	8,4	1031	1,2	[137] [142] [139]
Fenchone	9,87	10,45	1088	1,2	[139]
1R-α-Pinene	8,4	5,49	932	1,2	[142]
Myrtenal	6,98	14,74	1194	1,2	
trans-verbenol	5,95	12,5	1140	1,2	[142]
Camphor	4,18	12,75	1146	1,2	[137] [142]
Exo-fenchol	3,36	11,65	1119	1,2	
D-Limonene	3,35	8,29	1028	1,2	[137]
Borneol	2,3	13,79	1171	1,2	[137] [142]
Nopinone	1,54	12,4	1137	1,2	
3-Decanone	1,38	14,37	1185	1,2	
2E,6E-farnesol	1,26	36,68	1744	1,2,3	
β-Sabinene	1,24	6,53	971	1,2	
Camphene	1,12	5,93	948	1,2	[142]
β-Eudesmol	0,86	33,26	1650	1,2,3	[137]
Linalool	0,85	10,85	1099	1,2	
Iso-menthol	0,69	14,13	1179	1,2	
Cymene	0,65	8,13	1023	1,2	[137] [142]
Pinocarvone	0,57	13,35	1161	1,2	[139]
cis-methyl epi-jasmonate	0,57	34,3	1678	1,2,3	
α-campholenal	0,48	11,92	1126	1,2	
Carvone	0,46	16,75	1242	1,2	[137]
2E,4E-Nonadienol	0,44	15,74	1218	1,2	
cis-Verbenone	0,43	15,21	1206	1,2	
β-Myrcene	0,41	6,96	987	1,2	[139]
o-anisaldehyde	0,39	16,7	1241	1,2	
Pigmaein	0,35	26,87	1484	1,2,3	
E-methyl-dihydro-jasmonate	0,29	34,46	1682	1,2,3	
Acétate d'eugénol	0,27	28,13	1516	1,2,3	
Iso-borneol	0,26	13,16	1156	1,2	
Cryptone	0,26	14,28	1183	1,2	[137]
Camphene hydrate	0,24	12,88	1149	1,2	
Geranyl isovalerate	0,24	27,77	1506	1,2,3	
Tricyclene	0,23	5,24	922	1,2	
Epi-α-cadinol	0,23	29,07	1540	1,2,3	
Benzaldehyde	0,22	6,02	952	1,2	
Oxyde de linalool	0,2	10,35	1085	1,2	
trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	0,2	11,84	1124	1,2	
Endo-5-norbornene-2-methanol	0,19	9,75	1069	1,2	
Cyclohexyl propanoate	0,19	12,07	1129	1,2	
Iso-γ-E-bisabolene	0,19	24,65	1528	1,2,3	
Bisabolene	0,18	27,69	1504	1,2,3	
E-bisabol-11-ol	0,16	33,93	1668	1,2,3	
p-Cymen-7-ol	0,15	18,84	1291	1,2,3	
Neo-8-hydroxy-menthol	0,13	20,62	1333	1,2,3	
Artemisia cétone	0,1	9,3	1056	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	37,87				
Monoterpènes oxygénés	50,11				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,96				
Sesquiterpènes oxygénés	2,56				
Autre	7,49				
Totale	98,99				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

5. *Artemisia herba-alba*

L'hydrodistillation de la partie aérienne de l'armoise a enregistré un rendement de 1%. Ce résultat corrobore avec plusieurs études aussi menées sur des échantillons marocains [141][142], algériens [143] et israéliens [144], récoltés en pleine floraison. Généralement, une discordance en rendement a été remarquée en comparant entre différents pays cultivant l'*A. herba-alba*. En effet, le rendement au Maroc et en Tunisie a pu aborder 2% [145], [146], en Egypte 1,6%, en Algérie 1.5% [147], et en Jordanie 1,3% [148], alors qu'autres échantillons en Espagne et en Algérie n'ont pas dépassé 0,81 et 0,46% respectivement. Cela, est dû à plusieurs facteurs. En effet, en Algérie, des échantillons récoltés dans la même période et de différentes régions, ont montré un contraste considérable en rendement ayant varié entre 0,46 et 1,3% [149]. Ainsi, en Tunisie, le rendement obtenu de l'hydrodistillation de l'armoise récoltée de différentes régions, variant de 0,68 et 1.93%, a été influencé par les caractéristiques écologiques et climatiques de chaque région [150].

Le mois de récolte a influencé le taux du rendement dans l'étude réalisée par Ghanmi et son équipe [151]. En effet, pendant la récolte d'Avril, de Juin, et de Septembre, le rendement obtenu respectivement a été de 0,86 ; 1,23 et 0,5%. En revanche, Bellili *et al* [152] a étudié un autre paramètre pouvant influencé le rendement, qui est l'organe à extraire. En fait, l'extraction des feuilles seules, des feuilles et des branches, et des branches et des racines a permis l'obtention d'un rendement de 1,86 ; 0,46 et 0,25% respectivement. D'autre part, l'hydrodistillation de la partie aérienne de l'armoise blanche a été doublement rentable que l'extraction par micro-onde dont le rendement n'a pas dépassé 0,36% [153], hors que aucun changement de composition chimique n'a été observé.

L'analyse de l'HE de la partie aérienne d'*A. herba-alba* a permis d'identifier dix-huit composés constituant 94,58% de la totalité d'huile (Tableau 10).

La composition terpénique s'est marquée par la forte présence des monoterpènes oxygénés formant 88,7% de l'huile et représentés principalement par le chémotype piperitone formant 85,68% du huile totale, suivi par les sesquiterpènes oxygénés représentant 3,38%. Cependant que les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques ne représentent que 1,99% et 0,15% respectivement.

La biosynthèse des terpènes chez l'*A. herba-alba* s'est marquée par la présence usuelle d'un chémotype, et jusqu'à présent plusieurs ont été identifiés [55]. Des huiles ont été prédominées par un seul composés comme α -thujone et β -thujone qui peuvent atteindre 95% [55] [154]

[155], camphre[155], chrysanthone et acétate de chrysanthenyl [156], davanone, pinocarvone[8]. Et d'autre ont été co-dominées par deux composés et plus comme α -thujone/camphre, α -thujone/ β -thujone, et 1,8-cineol/camphre/thujone(α + β) [157].

Tableau 10: La composition chimique de l'HE d'*A. herba-alba*

Composés	Air%	TR	IR	Mode d'identification	Référence
Piperitone	85,68	17,26	1254	1,2	
Davanone	3,12	30,44	1575	1,2	[8]
A-terpinéol	1,77	14,75	1195	1,2	
p-cymène	1,31	8,13	1023	1,2	
Terpinén-4-ol	0,68	14,12	1179	1,2	
Fenchone	0,43	13,39	1162	1,2	
Criptone	0,23	14,37	1185	1,2	
D-Limonène	0,2	8,28	1028	1,2	
Coapène	0,15	22,28	1372	1,2	
(-)-Spathulenol	0,15	30,32	1572	1,2	
γ -Terpinène	0,14	9,29	1056	1,2	
cis-4-Thujanol	0,14	12,55	1141	1,2	
Lavender lactone	0,12	8,51	1034	1,2	
(+)-Spathulenol	0,12	30,32	1572	1,2	
3-Carene	0,11	10,84	1099	1,2	
1R- α -Pinene	0,1	5,48	931	1,2	
β -Myrcene	0,09	6,96	987	1,2	
β -Thujène	0,04	8,35	1029	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	1,99				
Monoterpènes oxygénés	88,7				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,15				
Sesquiterpènes oxygénés	3,38				
Autre	0,35				
Totale	94,58				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

6. Myrtus communis

L'hydrodistillation des feuilles du *M. communis* a donné un rendement de 0,5%. Généralement, le rendement de cette plante a reçu beaucoup d'intérêt de l'appart de beaucoup de chercheurs. Ainsi, nombreuses recherches ont été consacrées pour l'optimisation du rendement de son HE. Le résultat obtenu corrobore avec celui obtenu par la pluparts des études utilisant l'hydrodistillation des feuilles à l'état frais, variant entre 0,3 et 0,61% [158]–[160]. Cependant que quelques échantillons de myrte iranien ont fait l'exception par un rendement qui atteint 1,4% [161], et de celui syrien qui dépassent les 1,6% [162]. En revanche, plusieurs paramètres ont été criblés pour étudier leurs effets sur le rendement. Le taux d'humidité de la plante a significativement influencé le rendement. En effet, l'extraction des feuilles qui ont révélé un rendement en huile qui ne dépassent pas 0,55% à l'état frais, ont pu donner un rendement qui dépasse 1,6% à l'état sec [163]. Cependant que la saison de récolte n'avait pas d'influence considérable sur le rendement [164]. Ainsi, un criblage des facteurs environnementaux pouvant

influencer le rendement en huile du myrte a été réalisé par l'équipe de Fadil [165] suivant une étude chimométrique. Cette étude a rapporté que les individus ensoleillés, à petite taille, et à petites feuilles sont plus rentables en huiles que celles ombrées, de grande taille et à grandes feuilles.

Vingt-sept composés ont été identifiés lors de l'analyse de l'HE des feuilles du *M. communis*, constituant 90,3% de l'huile totale (Tableau 11). La composition chimique de cette huile est marquée par l'abondance des dérivés terpéniques représentant 36,15%, les monoterpènes oxygénés 35,16% et les monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 17,62%. Cependant que les sesquiterpènes ont été présents sous forme de trace 1,37%. Les principaux composés de l'HE des feuilles du myrte sont l'acétate de myrtenyl 33,67%, le 1,8 cinéol 19,77% et le limonène 8,96%. Peu de résultats corroborent avec ceux obtenus. En fait, Gardeli et son équipe [164] sont les seuls qui ont trouvé l'acétate de myrtenyl comme composé majoritaire à 39%. Cependant que la plupart des auteurs ont confirmé la présence de α -pinène comme majoritaire [161], [166]–[168]. Ainsi que le 1,8-cinéol [160], et le linalool [169]. Apart, l'étude comparative menée par Chalchat et al [170] a enregistré la différence entre les compositions chimiques des huiles des feuilles de myrte pendant la floraison, originaires de cinq pays différents. En fait, les échantillons du Yougoslavie ont été similaires à ceux marocains riches en 1,8 cinéol (32,5-37,5%), en α -pinène (18,5-25,0%), et en acétate de myrtenyl (14,8-21,1%). Ce dernier a été absent dans les huiles de la Tunisie, de Corsica, et du Liban riche en α -pinène (32%). Tisserand et al [55] résume les profils possibles du myrte, ses quatre premiers majoritaires souvent rencontrés, où α -pinène varie entre 18,5–56,7%, 1,8 cinéol varie entre 18,9–37,5%, l'acétate de myrtenyl entre 0,1–21,1%, et le limonène entre 5,1–12,7%.

Tableau 11: Composition chimique de l'HE de *M. communis*

Composés	Air%	TR	IR	Mode d'identification	Références
Acétate de myrtenyl	33,67	20,12	1321	1,2	[167]
linalool	19,77	10,87	1103	1,2	[167][171]
1,8-cinéol	10,65	8,41	1032	1,2	[167]
Limonène	8,96	8,29	1028	1,2	[167]
α -pinène	7,17	5,48	931	1,2	[167]
β -fenchyl alcohol	3,1	14,75	1195	1,2	
4,6-diethyl-2- methopyrimidine	1,35	27,91	1510	1,2	
o-cymène	1,05	8,13	1024	1,2	
methyl d'eugénol	0,96	23,37	1398	1,2	
α -Humulène	0,42	25,52	1451	1,2	[167]
1,2-epoxide Humulène	0,41	31,56	1604	1,2	
estragol	0,34	14,85	1197	1,2	
oxide de caryophyllène	0,32	30,48	1576	1,2	[167]
cis-oxide de linalool	0,27	9,75	1070	1,2	
trans-oxide de linalool	0,25	10,34	1087	1,2	

trans-Caryophyllène	0,22	24,06	1415	1,2	
terpinène-4-ol	0,2	14,13	1180	1,2	[171]
acétate de Néryl	0,18	21,62	1356	1,2	[167]
phénol	0,18	28,56	1527	1,2	
α -Thujène	0,16	5,28	924	1,2	[167]
δ -3-carène	0,15	7,61	1009	1,2	
β -pinène	0,13	6,69	977	1,2	[167]
cis-3-hexenyl butanoate	0,12	14,48	1188	1,2	
citral	0,1	17,78	1266	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	17,62				
Monoterpènes oxygénés	35,16				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,64				
Sesquiterpènes oxygénés	0,73				
Autres	36,15				
Totale	90,3				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

7. *Mentha spicata*

Un rendement en HE de 0,7% a été obtenu par l'hydrodistillation de la partie aérienne de *M. spicata*. Le rendement en HE de cette plante dépend de plusieurs facteurs. En effet, une étude a montré que le rendement en HE, influencé par la saison, varie entre 0,1% en Avril et 1,8% en fin d'été / début d'automne [172]. Une autre étude a montré que le rendement peut être influencé par la méthode d'extraction, où le rendement a dépassé les 10% avec une optimisation de l'extraction par le CO₂ supercritique [173].

Cinquante-cinq composés ont été identifiés lors de l'analyse de l'HE de *M. spicata*, formant 96,34% de l'huile totale (Tableau 12), avec une abondance de monoterpènes remarquable représentant 31,53% de ceux hydrocarbonés et 43,68% de ceux oxygénés. Pendant que les sesquiterpènes ne représentent que 10,22% de ceux hydrocarbonés, et 0,3% de ceux oxygénés.

Quatre composés majoritaires ont été identifiés, le carvone 26%, le 1,8-cinéol 15,2%, le β -myrcène 12,5% et le limonène 10,29%. Ces résultats concordent avec ceux déjà publiés surtout pour le carvone, qui a été enregistré comme composé majoritaire pour la plupart des études menées sur la composition chimique de l'HE de *M. spicata*, [174]–[177]. Tisserand et al [55] résume cela, et propose un profil générale à cette HE, variant pour le carvone entre 57.2 et 68.4%, pour le limonène entre 9.1 et 13.4%, et pour le β -Myrcene entre 2.3 et 4.7%.

Tableau 12: Composition chimique de l'HE de *M. spicata*

Composés	Air %	TR	IR	Mode d'identification	Références
Carvone	26,00	21,69	1358	1,2	[173][176]
1,8 cineol	15,20	8,41	1031	1,2	[173]
,β,-Myrcene	12,50	6,96	987	1,2	[176]
D-Limonene	10,29	8,29	1028	1,2	[173]
D-Germacrene	6,86	26,56	1476	1,2	
Caryophyllene	6,41	24,06	1415	1,2	
β-Pinene	3,03	6,69	977	1,2	
1-Butanone	2,08	23,11	1392	1,2	
1R-α-Pinene	1,72	5,49	932	1,2	[176]
β-Phellandrene	1,58	6,53	971	1,2	
(E)-β-Famesene	1,18	25,51	1451	1,2	
γ-Elemene	0,77	27,13	1490	1,2	
(E)-β-ocimène	0,75	8,47	1033	1,2	
Acide pentanoïque	0,47	16,42	1234	1,2	
(-)-β-Bourbonene	0,43	22,59	1380	1,2	[176]
γ-Terpinene	0,37	9,3	1056	1,2	[176]
Limonène	0,35	14,74	1194	1,2	
Resorcinol	0,34	12,19	1132	1,2	
β-Elemene	0,34	22,86	1386	1,2	
2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene-bicyclo-1-decene(4.4.0)	0,32	25,79	1458	1,2	
β-Methylallylbenzene	0,30	10,49	1089	1,2	
α- Terpinolène	0,28	10,29	1084	1,2	
2-Methylbutyl valerate	0,26	11,16	1107	1,2	
2,4-Hexadiene, (E,Z)-	0,26	20,11	1321	1,2	
d-cadinene	0,25	28,06	1514	1,2	
(.+/-)-Pulegone	0,24	16,5	1236	1,2	[176]
5-Isopropenyl-2-methylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	0,24	20,71	1335	1,2	
Citronellol	0,23	16,07	1226	1,2	
acide Isovaleric	0,23	11,09	1105	1,2	
Terpinène- 4 - ol	0,23	14,12	1179	1,2	
(+)-4-Carene	0,23	7,87	1016	1,2	
cis-Sabinhydrat	0,22	9,75	1069	1,2	
cis-Z-,α,-Bisabolene epoxide	0,20	30,48	1576	1,2	
α-Terpinéol	0,19	13,71	1169	1,2	
γ-Selinene	0,19	32,03	1617	1,2	
linalool	0,18	10,85	1099	1,2	[173] [176]
3-Octanol	0,17	7,19	996	1,2	
Cymen-8-ol	0,17	14,41	1186	1,2	
n-Amyl isovalerate	0,16	10,95	1102	1,2	
α-Muurolene	0,15	26,35	1471	1,2	
α-ocimene	0,15	8,85	1043	1,2	
β-Citronellol	0,15	18,01	1271	1,2	
cis-Jasmone	0,15	22,99	1389	1,2	
Copaene	0,14	22,27	1372	1,2	
Acide butanoïque	0,14	16,2	1229	1,2	
Spatulenol	0,13	30,31	1572	1,2	[176]
Isopiperitenone	0,13	17,8	1266	1,2	
l-calamene	0,12	28,12	1515	1,2	
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	0,11	20,43	1328	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	31,53				
Monoterpènes oxygénés	43,68				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	10,22				
Sesquiterpènes oxygénés	0,33				
Autres	10,57				
Totale	96,34				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcane sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

8. *Pelargonium asperum*

L'analyse de composition chimique de l'HE de la partie aérienne du *P. asperum* a permis d'identifier soixante-douze composés représentant une air cumulée qui correspond à 97,09% des aires cumulées de l'ensemble des constituants (Tableau 13).

Parmi les composés terpéniques identifiés, les monoterpènes oxygénés représentent la classe majoritaire avec 49,38%, contre 3,57% de monoterpènes hydrocarbonés. En plus de la classe des sesquiterpènes hydrocarbonés représentant 14,71% contre 2,11% de ceux oxygénés. Ainsi, d'autres dérivés terpéniques ont représenté 27,32% de l'huile totale.

Les composés prédominant dans cette huile sont citronellol (25.07 %), formate de citronellyl (10.53 %), géraniol (10.46 %), anthranilate de buthyl (5.93 %) et isométhone (5.88%). Ces résultats supportent ceux obtenus par plusieurs études de la composition chimique de l'HE de la partie aérienne du géranium, prédominée souvent par le citronellol [178]–[182].

Cependant, L'étude de l'huile des feuilles et l'huile des tiges séparément, a montré la non-similarité de leurs compositions chimiques, où la première répande le citronellol plus que la deuxième, et le contraire pour le géraniol [183]. Généralement, l'équipe de Tisserand [55] et celui de Ghedira [108] disent que l'HE du *P. asperum* récolté en Chine, en Egypte, au Maroc, et à la réunion, ont été prédominés par le citronellol et le géraniol. Ainsi, le linalool a été trouvé parmi les composants principaux des HEs des pays cités, à l'exception de celle chinoise.

L'utilisation d'une méthode d'extraction, autre que l'hydrodistillation peut influencer la composition chimique. En effet, l'extraction par micro-extraction sur phase solide a mis en évidence la présence majoritaire d'iso-menthone contre le citronellol extrait par l'hydrodistillation. En revanche, la composition chimique de l'huile extraite de la plante à l'état frais, comparée à celle à l'état sec, n'a pas enregistré de différence significative avec l'hydrodistillation. Cependant, α -guaiène a représenté le composé majoritaire de l'huile extraite de la plante fraîche par la microextraction sur phase solide, contre l'iso-menthone extrait de la plante sèche [184].

L'étude menée sur le type de culture adopté pour le géranium n'a montré aucune influence sur la composition de son HE. En effet, ni sa culture intercalaire avec la menthe (*Mentha arvensis* L), ni l'espacement entre ses rangs n'ont montré un changement au niveau de la composition de sa HE prédominée par le citronellol et le géraniol [185], [188].

Tableau 13 Composition chimique de l'HE de *P. asperum*

Composés	Air%	TR	IR	Mode d'identification	References
Citronellol	25,07	16,0945	1226	1, 2	[180], [181], [188]
Formate de citronellyle	10,53	18,0255	1272	1, 2	[188]
Géranol	10,46	17,0653	1249	1, 2	[180], [188]
Buthyl anthranilate	5,94	32,0361	1617	3	
Isomenthone	5,88	13,4688	1163	3	[180], [181], [188]
Formate de géranyle	4,10	19,0741	1296	1, 2	[180], [188]
Linalool	3,62	10,8512	1099	1, 2	[180], [181], [188]
Benzyl acetyl acetate	3,06	26,9484	1486	3	
β -Bourbonéne	2,13	22,5875	1379	1, 2	[180], [188]
β -Chamigréne	1,98	26,5515	1476	3	
Caryophylléne E	1,97	24,0519	1415	1, 2	
γ -cadinène	1,90	28,0588	1514	1, 2	[180], [181], [188]
Cis-oxide de rose	1,55	11,2401	1109	1, 2	[180], [188]
1R- α -Pinene	1,22	5,4846	931	1, 2	[180], [181], [188]
α -Copaène	1,12	22,2657	1372	3	[180], [181]
Germacrone	1,07	34,8871	1693	3	
2E,4Z-ethyl-decadienoate	0,95	26,2002	1467	3	
Epi- β -santalène	0,86	25,2695	1445	3	
Nootkatène	0,81	28,2116	1518	3	
Phenyl ethyl tiglate	0,77	30,6227	1580	1, 2	[181]
α -Patchoulène	0,71	25,6825	1455	3	
Trans-Menthone	0,69	13,1014	1154	3	[180], [188]
α -Guaïene	0,63	24,9691	1437	3	
Trans-rose oxide	0,59	11,8811	1125	1, 2	[180], [181], [188]
p-Cymene	0,55	8,1344	1023	1, 2	[180], [188]
Acétate de géranyl	0,52	22,4534	1376	1, 2	[181]
Trans muurola-3,5-diène	0,47	25,5136	1451	3	
Trans-g-macrocarpène	0,44	28,6005	1528	3	
Maltyl-isobutyrate	0,42	27,2837	1494	3	
Germacrene A	0,40	27,8496	1508	3	[180]
Drim-8(12)-ène	0,39	27,1442	1491	3	
D-Limonene	0,35	8,2873	1028	1, 2	[180], [181], [188]
α -Terpinyl isobutanoate	0,34	26,3316	1471	3	
α -Terpineol	0,34	14,7455	1194	1, 2	[180], [188]
Geranial	0,30	17,7814	1266	1, 2	[180], [188]
g-Muurolène	0,29	26,6588	1479	3	
Cis-calamenen-10-ol	0,28	33,6292	1660	3	
α -Longipinène	0,27	21,2519	1348	3	
β -Pinène	0,27	6,9597	987	1, 2	
Cis-ocimene	0,25	8,4723	1033	1, 2	[180], [188]
Trans-ocimene	0,25	8,8451	1043	1, 2	[180], [188]
α -Cubebene	0,24	21,0776	1344	1, 2	[188]
β -Vetivenene	0,21	29,6143	1554	3	
β -Eudesmol	0,20	33,251	1649	3	[188]
Undecanoate de méthyle	0,19	24,4837	1425	3	
Z-néral	0,19	16,5209	1236	1, 2, 3	
α -Funebrene	0,15	23,5477	1402	3	
Trans-cadina-1,4-diène	0,15	28,7668	1532	3	
Spathulenol	0,14	30,5047	1577	3	
β -Phellandrène	0,14	8,357	1030	1, 2	
α -Calacorène	0,14	28,9438	1537	1, 2	
Menthol	0,13	14,4719	1188	1, 2	
β -Elemene	0,13	22,8531	1386	1, 2	
Isobornyl-2-methyl-butanoate	0,13	28,4235	1523	3	
α -Phellandrene	0,13	7,539	1007	1, 2	[180], [188]
2-Phenyl ethyl butanoate	0,12	25,0603	1439	3	
Modeph-2-ène	0,10	22,7082	1382	3	
Monoterpènes hydrocarbonés		3,57			
Monoterpènes oxygénés		49,38			

Sesquiterpènes hydrocarbonés	14,71
Sesquiterpènes oxygénés	2,11
Autres	27,32
Totale	97,09

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcane sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

9. *Ormenis mixta*

L'analyse chromatographique de l'HE des sommités fleuries d'*Ormenis mixta* poussant à l'état sauvage dans la région de Taounat a dévoilé quatre-vingt-huit composés représentant 98,26% de l'huile totale (Tableau 14).

Parmi les composés terpéniques identifiés on note dans la fraction des monoterpènes 22,31% de ceux hydrocarbonés contre 17,62% de ceux oxygénés. Ainsi, la fraction sesquiterpénique composée de 27,26% de ceux hydrocarbonés contre 10,75% de ceux oxygénés.

Les composés majoritaires obtenus par l'hydrodistillation de la partie aérienne d'ormenie sont : 1,8 cinéol (10,28%), (E)- β -Famesene (9,04%), α -Pinene (8,54%) et le δ -Elemène (5,45%). Généralement, l'HE d'*O. mixta* est qualifiée de complexe, car elle contient des dizaines de composés, et ne possède aucun composé dominant.

L'HE d'*O. mixta* de la forêt de Maâmora [186] est composée principalement d'alcool de santoline (37,7 %), et d'autres constituants à des teneurs relativement faibles l' α -pinène (4,8 %), la camphénilone (4,8 %), l'alcool de yomogi (4,5 %), le germacrène (3,3 %), le 1,8-cinéole (3,2 %) et le cubéol (3,2 %). Le même composé majoritaire a été trouvé par l'équipe de Zrira étudiant la composition chimique de l'HE de Salé et de Kénitra [187].

L'étude menée par l'équipe d'Elouaddari [19] a aussi prouvé le polymorphisme chimique important rencontré chez *O. mixta*. En effet, ils ont montré que le profil chimique de 9 échantillons d'*O. mixta* de différentes régions du Maroc est très variable. La teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes. En fait, à Benguerir, Kenitra, Settlat, Meknès et Tamesna on rencontre le camphre (14-27%), le β -myrcène (3-17%) et le santolina triene (3-15%). Tandis que celui de Chefchaouane on trouve β -myrcène (3-17%), trans- β -farnésène (18%) et tridécane (16%). Alors que celui d'Oujda est dominé par β -farnésène (43%), celui de Bouznika répand le Méthacrylate de 2-méthyl-2-trans-butényle (34%) et celui de Sidi Alal Ibahraoui contient la santoline (17%) et le 1,8-cinéole (12%).

Tableau 14: Composition chimique de l'HE d'*O. mixta*

Composés	Air%	TR	IR	Mode d'identification	References
Germacrène	11,46	26,56	1476	1,2	
1,8 Cinéol	10,28	8,4	1031	1,2	[19]
Cis-methyl d'isoeugénol	9,04	25,51	1451	1,2	
α -pinéne	8,54	5,48	931	1,2	
δ -Elemène	5,45	20,59	1332	1,2	
Cis-Cadina-1(6),4-diène	3,19	25,97	1462	1,2	
D-Limonène	2,71	8,28	1027	1,2	
β -Myrcène	2,57	6,95	987	1,2	[19]
Germacrène B	2,28	29,81	1559	1,2	
g-Patchoulène	2,23	27,59	1502	1,2	
Sesquithureferol	2,09	32,13	1604	1,2	
Terpinèn-4-ol	2,06	14,12	1179	1,2	
Sabinène	2,01	6,52	971	1,2	
10-epi-g-eudesmol	1,87	32,3	1621	1,2	
4,8- α -epoxy-Caryophyllane	1,85	24,06	1414	1,2	
γ -Terpinène	1,76	9,29	1056	1,2	
Maltyl isobutyrate	1,64	27,29	1494	1,2	
Isobornyl n-butanoate	1,42	26,42	1473	1,2	
Cis-dihydro-mayurone	1,34	31,22	1595	1,2	
g-Eudesmol	1,27	32,65	1630	1,2	
β -Selinène	1,22	27,13	1490	1,2	
Dihydro-citronéllole	1,08	14,74	1195	1,2	
Cis- β damascone	1,02	22,86	1386	1,2	
3-Cis-acétate d'hexenyle phényle	1	32,89	1633	1,2	
Angustione	0,91	22,27	1372	1,2	
α -Terpinène	0,88	7,87	1016	1,2	
Pentanoate de citronelle	0,85	32,53	1624	1,2	
2',3',3'-Trimethyl-2',3'-dihydroangelicin	0,85	41,78	1892	1,2	
Hydro-cinnamaldéhyde	0,82	31,57	1598	1,2	
o-Cymène	0,81	8,13	1023	1,2	
Spathulenol	0,71	30,48	1576	1,2	
Bornéol	0,7	13,78	1171	1,2	
2E-4E-Octadienol	0,56	11,44	1114	1,2	
Cis-carvyl-acétate	0,55	21,98	1365	1,2	
Dehydro-aromadendrane	0,53	25,89	1460	1,2	
α -Macrocarpène	0,51	26,34	1471	1,2	
Perillène	0,48	10,96	1102	1,2	
α -Terpinolène	0,47	10,29	1084	1,2	
Cis-trans-jasmonol	0,46	20,44	1328	1,2	
Trans-tagétone	0,43	12,49	1139	1,2	
Hexyl-isovalerate	0,42	18,17	1241	1,2	
β -Pinéne	0,39	6,69	977	1,2	
3-cis-angélate d'Hexenyle	0,39	18,46	1275	1,2	
2-cis, 6-trans-farnesol	0,37	35,9	1722	1,2	
2-Phenyl ethyl tiglate	0,35	30,83	1585	1,2	
Hinesol	0,35	33,31	1640	1,2	
2E,4E-Heptadienol	0,3	7,76	1013	1,2	
Hexyl-2-methyl-3-pentenoate	0,3	20,1	1321	1,2	
g-Asarone	0,3	30,31	1572	1,2	
Camphène	0,25	5,72	940	1,2	
Cis-dihydro- α -terpinéol	0,24	13,35	1160	1,2	
2-cis- valérate d'hexenyl	0,23	19,08	1282	1,2	
α -Thujéne	0,22	5,27	923	1,2	
3E-2-Furyl-acrolein	0,22	11,16	1107	1,2	
α -Chamipinene	0,22	23,29	1396	1,2	
2,5-Dimethyl styrène	0,2	10,84	1099	1,2	
Iso-Jasmone	0,18	22,99	1389	1,2	
Cis-p-menthan-2-one	0,17	15,04	1195	1,2	
Germacrene A	0,17	27,85	1508	1,2	

Cis- β -acétate de santalol	0,17	39,24	1817	1,2
δ -3-Carène	0,16	7,65	1010	1,2
(2E)-acétate d'octénol	0,16	15,33	1208	1,2
Isolemicin	0,16	30,16	1568	1,2
Acétate d'éléamol	0,16	34,4	1680	1,2
p-Cymenène	0,15	10,48	1089	1,2
Chrysanthemyl alcool	0,15	13,07	1153	1,2
n-Décanal	0,14	15,33	1202	1,2
Cis-8-hydroxy-linalool	0,14	32,2	1619	1,2
Longibornéol	0,13	31,34	1598	1,2
Oxide de dehydroxy cis-linalool	0,12	7,53	1006	1,2
Cis-acétate de pinocarvyl	0,12	19,7	1311	1,2
Methyl undecanoate	0,12	24,48	1425	1,2
Ethyl 3-methyl-pentanoate	0,11	5,92	948	1,2
Trans-vértrocitral C	0,11	11,08	1105	1,2
1-Phenyl-pentan-3-one	0,11	20,74	1336	1,2
Acétate d'hexenyl	0,1	7,48	1005	1,2
α -Eudesmol	0,1	34,36	1651	1,2
Monoterpènes hydrocarbonés	22,31			
Monoterpènes oxygénés	17,62			
Sesquiterpènes hydrocarbonés	27,26			
Sesquiterpènes oxygénés	10,75			
Autres	20,35			
Totale	98,26			

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

10. *Citrus aurantium* (Feuilles)

L'hydrodistillation des feuilles de l'arbre de *C. aurantium* a permis d'obtenir un rendement en HE de 0,8%. Cette valeur reste proche à celle trouvée par Sharma *et* Vashist [188], cependant qu'elle dépasse doublement celle trouvée par Metoui et son équipe [189]. Une des recherches menée sur le rendement de cette huile a lié sa variation à la saison qui a enregistré une différence minime entre le mois d'Avril, juillet et septembre [21], Une autre étude a lié cette variation au temps d'extraction où la différence a été largement significative.

Suivant la littérature, la variation du rendement de l'HE des feuilles du bigaradier a été liée à la saison, où le rendement

L'analyse de la composition chimique de l'HE obtenus de l'hydrodistillation des feuilles du bigaradier a permis d'identifier seize composés représentant la totalité de l'huile.

Cette huile se compose principalement de dérivés terpéniques représentant 50,44% de l'huile totale, suivi de 45,82% des monoterpènes oxygénés. Cependant que les monoterpènes hydrocarbonés ne représentent que 3,57%. La présence des sesquiterpènes est significativement négligeable avec 0,17% de ceux hydrocarbonés et 0% de ceux oxygénés (Tableau 15).

Les composés majoritaires identifiés sont l'acétate de linalyl 41,88% ; le β -linalool 32,99% et le terpinène-4-ol 10,54%, En comparant ces résultats aux études précédentes, on remarque que

la teneur des deux premiers composés a varié dans l'HE des feuilles du *C. aurantium* conditionnellement. En effet, Druzic et son équipe [190] a trouvé 19,3% d'acétate de linalyl et 12,3% de linalool, Metaoui et ses collaborateurs [189] a trouvé 39,3% de linalool et 32,1% d'acétate de linalyl. L'étude menée par l'équipe d'Ellouze [21] a expliqué cette variation par l'effet de la saison de récolte qui joué un rôle significatif sur le taux des composés majoritaire, où le linalool a connu son maximum en mois d'Avril avec 65,97% et son minimum avec 43,2% en mois de novembre, contrairement à l'acétate de linalyl qui a connu son maximum avec 24,77% en mois de novembre, mais qui a été totalement absent en mois d'avril. Ainsi, L'âge de la feuille a été rapporté comme facteur influençant le profil chimique de l'HE [191]. En fait, le taux de linalool est plus important chez les jeunes feuilles que les vieilles, contrairement à l'acétate de linalyl. De pasquale et ses assistants [192], qui ont caractérisé cinq clones de *C. aurantium*, ont confirmé que le profil chimique de leurs HEs varie selon la morphologie et le germoplasme. En fait, le taux d'acétate de linalyl a pu atteindre 73,1% dans un clone, alors qu'il n'a pas dépassé 0,3% dans un autre. D'autres études ont montré que l'acétate de linalyl peut se dégrader en linalool, en nérol ou aussi en géraniol pendant une hydrodistillation à haute température [193], ce qui peut expliquer la présence de linalool pendant des périodes où l'acétate de linalyl doit dominer.

Tableau 15: Composition chimique de l'HE des feuilles du *C. aurantium*

Composés	Air %	TR	IR	Mode d'identification	Références
Acétate de linalyl	41,88	17,02	1248	1,2	[189]
β-Linalool	32,99	10,87	1100	1,2	[189] [190]
α-Terpineol	10,54	14,75	1195	1,2	[190]
Acétate de géranyl	5,68	22,46	1376	1,2	[190]
Acétate de neryl	2,88	21,62	1357	1,2	[190]
β-pinene	1,92	6,96	987	1,2	[189]
Nerol (cis-géraniol)	1,56	15,94	1223	1,2	[190]
(Z)-β-Ocimene	0,73	8,85	1043	1,2	
O-Cymen-5-ol	0,46	19,22	1300	1,2	
Limonene	0,36	8,29	1028	1,2	[189]
(E)- β-Ocimene	0,34	8,47	1033	1,2	
Trans-γ-Caryophyllene	0,17	24,05	1415	1,2	
Géranial (α-Citral)	0,15	17,78	1266	1,2	
Sabinene	0,12	6,53	971	1,2	[190]
Terpinen-4-ol	0,12	14,13	1179	1,2	[189]
α-Carène	0,1	10,29	1084	1,2	
Monoterpènes hydrocarbonés	3,57				
Monoterpènes oxygénés	45,82				
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,17				
Sesquiterpènes oxygénés	0				
Autres	50,44				
Totale	99,99				

TR : Temps de rétention sur la colonne capillaire DB-5 en minutes ; IR: Indice de rétention par rapport à n-alcanes sur la colonne capillaire DB-5. 1: comparaison de nos données avec la bibliothèque de spectre de masse NIST 2013. 2: comparaison de nos données avec la bibliothèque d'index de conservation 2014, 3: comparaison avec les données de la base de données Adams

11. *Citrus aurantium* Zest

L'hydrodistillation du zest du fruit de *C. aurantium* a révélé un rendement de 1,85%. En faisant appel à la bibliographie, ce rendement a été assez proche à celui trouvé l'équipede Sarrou [191] et par celui de Hosni [194] mais non pas à celui trouvé par l'équipe de Da Camara [195] qui n'a pas dépassé 0,55% malgré qu'il est récolté aussi en janvier.

L'analyse de l'HE obtenue du Zest du fruit du *C. aurantium* a permis l'identification de trois composés représentant 97,88% de l'huile totale. Une teneur qui atteint 96% de limonène a été enregistrée, cependant que le sabinene et le δ -3-carene n'ont représenté que 0.45 % 1.43 % respectivement. Ces trois composés représentent à la fois la teneur de l'huile en monoterpènes hydrocarbonés. Les études déjà menées sur la composition de l'HE du zest ont révélé que le D-limonène a été toujours le composé majoritaire [191], [195], [196]. Sa teneur peut varier suivant la saison[197], ou, aussi suivant le stade de maturité [198].

IV- Conclusion

Les HEs sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines de composés. La valorisation de ces extraits peut commencer par la détermination de leurs compositions chimiques qui peuvent mieux orienter leurs utilisations.

Cette recherche a été focalisée sur l'analyse des HEs de cinq *Lamiaceae*, deux *Asteraceae*, un *Myrtaceae*, un *Geraniaceae* et un *Rutaceae*. L'évaluation de la productivité de ces espèces en termes d'HE en plus de l'identification des constituants de ces huiles nous a permis de conclure que :

Les rendements en HEs obtenus ne s'écartaient pas de la moyenne comparés à d'autres études.

La composition chimique analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a montré la teneur remarquable des onze HEs en monoterpènes, en composés phénoliques, en alcools, en éther, en cétone..., des composés connus généralement par leur effet antibactérien et antioxydant. Dans ce sens, les chapitres à voir dans ce manuscrit seront dédiés à la valorisation de ces deux effets influençant différentes industries surtout alimentaires et pharmaceutiques.

Chapitre II : Activité antibactérienne : Criblage, détermination de la CMI et de la CMB

I. Introduction

Les HEs sont des métabolites secondaires de plantes qui sont bio-synthétisés pour protéger la plante des facteurs extrinsèques. En fait, plusieurs espèces sont dotées d'un effet antibactérien potentiel.

Les composants à fortes concentrations (terpènes, terpénoïdes, molécules à cycle aromatique) jouent un rôle majeur dans l'effet antibactérien / biologique des HEs [17]. Parmi leurs composés antibactériens importants : les phénols, les alcools, les éthers, les aldéhydes, les hydrates de carbone et les cétones[199]. Les HEs avec des aldéhydes ou des phénols en tant que composants principaux (cinnamaldehyde, citral, carvacrol, eugenol ou thymol) sont les plus efficaces, suivies des huiles contenant des alcools terpéniques [30]. Les HEs avec des cétones ou des esters (β -myrcène, α -thujone ou acétate de géranyle) possèdent une activité généralement plus faible [73], [200].

Aujourd'hui, certaines HEs brutes comme l'origan, le thym, le basilic et la cannelle ont été classées comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration des États-Unis). De même, plusieurs composés, y compris le thymol, le carvacrol, le linalool, le carvone, l'eugénol, le cinnamaldehyd, le citral et le limonène, ont été acceptés pour être utilisés dans les aliments par la Commission européenne [116].

D'après tout ce qui précède, ce chapitre, aura pour objectif l'évaluation de la corrélation entre la composition chimique obtenue et l'effet antibactérien de chaque huile analysée sur quatre souches bactériennes : les bacilles et les cocci du Gram positive représentées respectivement par *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, et deux bacilles du Gram négative représentée par *Escherichia coli* (entérobactérie) et *Pseudomonas aeruginosa*.

II. Matériel et méthodes :

1. Souches microbiennes cibles

Bacillus subtilis ATCC 3366, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Conservation des souches

A partir de cultures fraîches de microorganismes préparées sur gélose nutritive, on racle avec une anse stérile sous hotte à reflux laminaire, des colonies identiques, on essuie l'anse sur la paroi des tubes remplis de bouillon nutritif. Après incubation à la température adéquate de chaque germe pendant 16 à 18 heures, dans des tubes Eppendorf, 1 mL de l'inoculum est mélangé avec 1 mL de glycérol 40% déjà stérilisé par filtration (milifiltre 0,45 μ m).

3. Milieux de culture

La gélose nutritive (Pronadisa), destinée aux microorganismes non exigeants, a été utilisée pour le repiquage des bactéries.

La gélose de Muller Hinton (Biokar diagnostics, Beauvais, France) a été utilisée pour le criblage d'activité antibactérienne (aromatogramme), et le bouillon supplémenté de 0,15% d'agar pour la détermination des CMI des HE contre les bactéries.

4. Préparation des bactéries (culture fraîche)

Dans des conditions aseptiques (hotte à flux laminaire), à partir d'un stock de microorganismes conservés à -20°C dans du glycérol (20%), on ensemence par anse stérile sur boîte de Pétri contenant une gélose nutritive pour les bactéries, et PDA pour les champignons préalablement autoclavés (121°C /4bar/15 min) et on les pré-incube pendant 24 h à 37°C (bactérie) et à 25°C (champignon).

5. Préparation de la solution BaSO₄ (0,5 McFarland).

Pour préparer la solution BaSO₄, 0,5 ml de la solution (BaCl₂, 0,048 mol/L) est ajoutée à 99,5 mL de (H₂SO₄, 0,18 mol/L). La vérification de la densité par spectrophotomètre est lue à 625nm, à une densité optique DO de 0,08 à 0,10 ce qui correspond à 0,5 Mc Farland[201].

6. Préparation d'inoculum

Les manipulations réalisées demandaient deux inocula à préparer : Le 1^{er} équivalent à 10^8 UFC/mL utilisé pour le test de diffusion sur disque d'agar, et le 2^{ème} équivalent à 10^6 UFC/mL utilisé pour la détermination des CMI et pour les tests de formulation.

Sous hotte à flux laminaire, à partir d'une culture pure et fraîche, on racle des colonies parfaitement identiques à l'aide d'une anse stérile, et on prépare une suspension en solution saline « Eau physiologique » (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/mL). L'opacité de la suspension bactérienne après homogénéisation au vortex doit être équivalente à 0,5 McFarland, tout en la comparant à la solution BaSO₄ préparée.

En suite, 200 μ L de l'inoculum préparé sont ajoutés à 19800 μ L de MHB supplémenté de 0,15% d'agar, homogénéisés au vortex, pour obtenir 10 mL d'inoculum de 10⁶ UFC/mL.

L'ensemencement doit se faire dans les 15min qui suivent la préparation de l'inoculum.

7. Diffusion sur disque d'agar

La méthode de diffusion sur disque d'agar a été réalisé suivant le protocole décrit par CLSI [201]. Des boîtes de Pétri de Muller-Hinton sont inoculées par inondation, où 1mL de l'inoculum de 10⁸ UFC/mL est étalé sur toute la surface de la boîte, puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micropipette. Un disque de papier-filtre (6 mm) est déposé sur la boîte de gélose déjà séchée sous la hotte, En suite, 10 μ L de chaque HE sont déposés sur le disque. L'HE diffuse à partir du papier filtre dans la gélose au réfrigèrent pendant 2h, pour échapper toute diffusion des huiles dans l'atmosphère de la boîte. Le test a été répliqué 3 fois pour chaque huile. Après incubation à 37 ° C pendant 18 à 20 h, les zones d'inhibition sont mesurées.

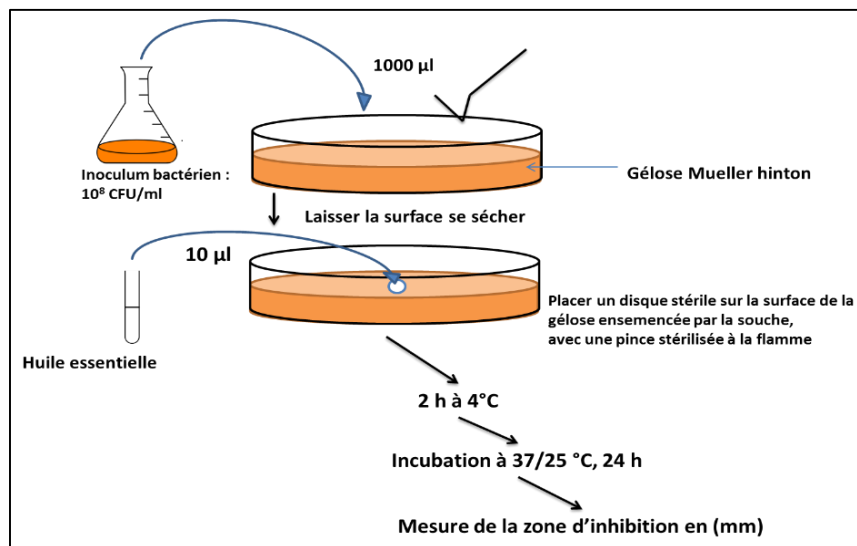


Figure 12: Schéma descriptif de la méthode de diffusion sur disc d'agar

8. Concentration minimale inhibitrice

La CMI a été réalisée en microplaque 96 puits en utilisant un dosage de micro-dilution, tel que décrit par [202]. Au début, dans une microplaque 96puits, à partir d'une solution mère de HE, une série de dilution de chaque HE est préparée dans du MHB (0,15% d'agar) pour un volume final de 50 μ L pour chaque concentration. Ensuite, 50 μ L de l'inoculum bactérien de concentration finale de 10⁶ UFC/mL. 50 μ L de l'inoculum préparé sont ajoutés aux différentes concentrations de la série de dilution. Après incubation à 37 ° C pendant 18 à 20 h, 5 μ L de résazurine est ajoutés à chaque puits comme indicateur de la croissance bactérienne. Le 12^{ème} puits a été considéré comme le contrôle de la croissance. Après une incubation à 37 ° C pendant

2 h, la croissance bactérienne a été révélée par le changement de coloration du violet au rose. La valeur MIC est déterminée comme étant la plus faible concentration qui empêche un changement de couleur de la résazurine. Le test a été répliqué 3 fois pour chaque huile.

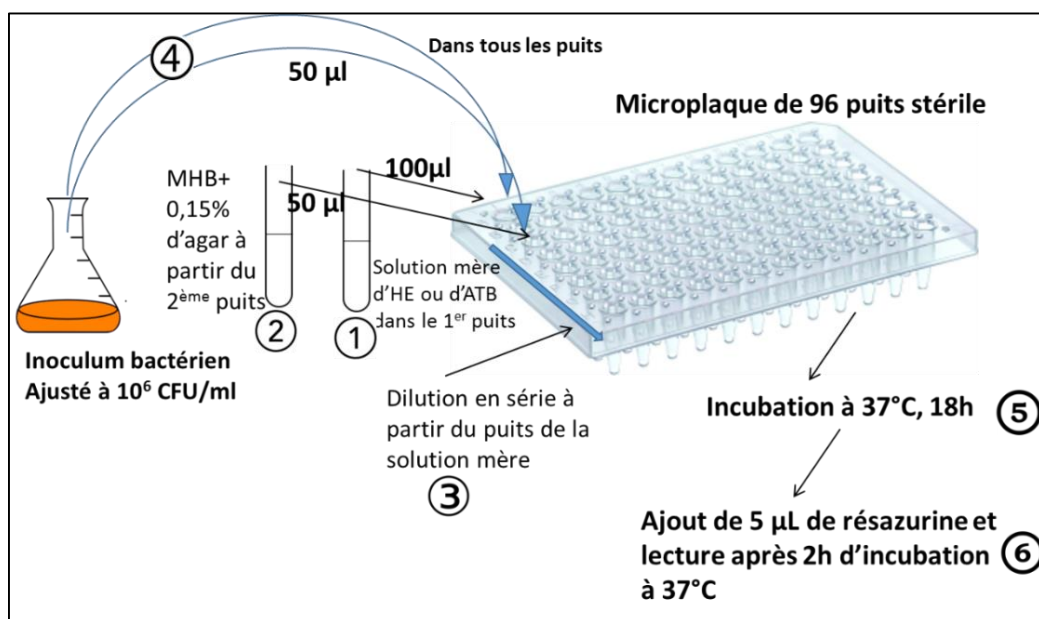


Figure 13: Schéma descriptif de la méthode déterminant la CMI

9. Concentration minimale bactéricide

La CMB a été effectuée suivant le CLSI [201], la valeur CMB correspond à la plus faible concentration d'HEs produisant des sous-cultures négatives après incubation à 37 ° C pendant 24 heures. Elle est déterminé par étalement de 5µL des puits négatifs sur des boîtes de Pétri remplies de Lauria Bertani (LB) gélosé. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

III. Résultats et discussion :

1. Diffusion sur disque d'agar - Criblage antibactérien

L'activité antibactérienne des onze HEs étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Généralement, cette méthode est sensible, facile à mettre en œuvre et nécessite un faible volume d'échantillon. Cependant que cette technique ne peut être utilisée juste que pour une mise en évidence qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile [203].

Les zones d'inhibition obtenues pour les quatre souches sont représentées sur le tableau (16). D'après les zones d'inhibition générées par les HEs étudiées, celles d'*O. compactum* et de *T. serpyllum*, suivi par celle d'*O. majorana* représentent significativement la meilleure activité

antibactérienne contre les quatre souches étudiées. Cependant que les HEs d'*O. mixta* et du zest des fruits de *C. aurantium* représentent significativement la plus faible activité antibactérienne sur l'ensemble des souches testées. La sensibilité des souches vis-à-vis les HEs de *A. herba-alba*, *M. spicata*, *C. aurantium* feuilles, *L. dentata*, *M. communis* et *P. asperum* reste modérée et spécifique.

Par ailleurs, *B. subtilis* est la seule souche qui a été sensible à toutes les HEs étudiés, tandis que *P. aeruginosa* a été la souche la plus résistante avec une sensibilité modérée à six huiles seulement.

Généralement, l'activité antibactérienne des HEs étudiées a été déjà prouvée par plusieurs études. L'HE d'*O. compactum* a été montrée active contre plusieurs souches comme *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, et *P. fluorescens*[112]. Comme elle a été active contre *P. putida* isolés de la viande[113]. Ainsi, sa forte capacité antifongique a été déjà prouvée contre *Botrytis cinerea* [114]. Un large spectre antibactérien de l'HE de *T. serpyllum* a été mis en relief par Hussain et ses collaborateurs [133] contre plusieurs bactéries comme *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. pumilis*, *B. cereus*, et *S. poona*, ainsi que par l'équipe de Rasooli [130] contre *K. pneumonia*. L'activité antibactérienne de cette huile a été démontrée aussi par la méthode de la micro-atmosphère [204]. Le criblage de l'activité antimicrobienne de l'HE d'*O. majorana* a permis de découvrir son potentiel inhibiteur considérable contre vingt-cinq souches[205]. Ainsi, Hajlaoui *et al* [129] a montré le potentiel antimicrobien de cette huile sur douze bactéries et treize champignons. L'HE obtenue du *P. asperum* n'a pas fait l'exception. En fait, son effet antimicrobien, peu étudié, a été démontré par l'équipe d'Atailia [181] sur dix souches bactériennes dont quatre sont de référence, à noter *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Cette huile a été aussi efficace contre la croissance de *candida albican* ainsi que contre la formation de ses filaments[206]. Un pouvoir antifongique a été aussi révélé contre *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, et *Penicillium digitatum* [178]. L'HE du *M. communis* a démontré sa puissante activité antimicrobienne contre les agents pathogènes d'altération alimentaire (bactéries et champignons) [207]. Ainsi, Akin et son équipe [171] a montré que cette huile a été plus efficace que la Meticilline sur *E. coli* et *P. aeruginosa*, que la Gentamicine sur *S. aureus* et *E. coli*, et que la Norfloxacin sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*. L'activité antimicrobienne de l'huile de la menthe verte a été efficace contre quatre souches de bactéries : *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* et *P. multocida* et cinq champignons pathogènes : *A. niger*, *M. mucedo*, *F. solani*, *B. theobromae* et *R. solani* [177]. Ainsi des propriétés antifongiques contre les pathogènes humains *Trichophyton rubrum* et *Trichosporon*

beigelii ont été démontrés[208]. Les HEs d'*A. herba-alba* et de celle de *L. dentata* ont un large spectre antibactérien. Toutefois, cet effet est souche-dépendant. Dans cette étude, ces deux huiles n'ont pas dévoilé d'effet contre *P. aeruginosa*. alors qu'elles ont été déjà actives contre plus que neuf souches bactériennes [209][210]. L'HE des feuilles du *C. aurantium* est connue par son effet antibactérien qui a été déjà prouvé [196][211]. Ellouze *et al* ont démontré même que cette activité demeure présente même s'elle varie avec le changement de la saison [21]. Cet huile est doté aussi d'un effet antifongique remarquable contre *F. oxysporum* *B. sorokiniana* *F. avenaceum* *B. cinerea* et *F. solani*[189]. Par contre l'HE du zest du fruit du bigaradier est connue par son effet antibactérien modéré, sinon absent, ce qui corrèle avec nos résultats [212] [213]. L'effet antibactérien de l'HE de l'*O. mixta* n'a pas été suffisamment étudié. En revanche, l'étude de l'huile de l'ormenie de Maamoura a démontré une haute activité antibactérienne et antifongique [186].

Tableau 16: Zones d'inhibition des HEs étudiées

Souches Plantes	Zones d'inhibition (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>O. mixta</i>	11,33±0,58 ^a	9,33±0,58 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a
<i>C. aurantium</i> Z	11,33±2,31 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
<i>A. herba-alba</i>	12,17±0,29 ^{a,b}	12,17±0,29 ^b	11,00±1,73 ^b	0,00 ^a
<i>M. spicata</i>	14,16±0,76 ^{a,b,c}	11,83±0,76 ^b	9,66±0,58 ^{a,b}	9,33±1,15 ^b
<i>C. aurantium</i> F	14,33±1,53 ^{a,b,c}	12,33±1,53 ^b	10,66±0,58 ^{b,c}	0,00 ^a
<i>L. dentata</i>	15,33±1,15 ^{a,b,c}	10,66±0,57 ^b	12,00±1,73 ^{b,c}	9,66±1,53 ^{b,c}
<i>M. communis</i>	18,33±1,53 ^{a,b,c}	17,00±1 ^b	11,5±0,5 ^{b,c}	0,00 ^a
<i>P. asperum</i>	20,66±3,06 ^{b,c}	11,66±0,58 ^b	8,66±1,15 ^{a,b}	8,33±0,58 ^b
<i>O. majorana</i>	19,66±1,52 ^c	16,33±2,51 ^b	20,33±2,30 ^{c,e}	9,66±0,57 ^{b,c}
<i>T. serpyllum</i>	33,00±2,64 ^e	36,00±1,73 ^c	21,66±2,08 ^e	10±1,73 ^c
<i>O. compactum</i>	41,66±2,88 ^e	46,66±2,88 ^c	34,33±8,32 ^e	9,00±1 ^{b,c}

Dans la même colonne, les moyens suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents ($p \leq 0.05$) tel que déterminé par le test de Tukey

2. Concentration minimale inhibitrice

Dans le tableau (17), sont consignés les résultats des CMI % (v/v) des HEs des différentes plantes étudiées. Le potentiel inhibiteur des HEs a été confirmé par les tests de détermination de la CMI. *B. subtilis* a montré sa haute sensibilité vis-à-vis les onze huiles étudiées, avec des valeurs de CMI qui varient entre 0,031% et 2%. Cependant que *P. aeruginosa* a montré sa résistance avec des valeurs de CMI qui dépassent 4%. Une sensibilité Gram-dépendante a été aussi observée, en fait, les Gram positif ont été plus sensibles que les Gram négatif, et les CMI de *B. subtilis* et *S. aureus* varient entre 0,031% et 2%, cependant que celles d'*E. coli* et *P. aeruginosa* dépassent les 4%.

Généralement, l'effet antibactérien des HEs a été lié par différents auteurs aux différentes fonctions organiques existantes (hydrocarbures, alcools, cétones, aldéhydes, esters et acides). Cet effet est estimé selon l'inhibition de la croissance, et décroît selon l'ordre suivant : (+) **Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Éthers > Hydrocarbures (-)**

Evidemment, l'activité antibactérienne est aussi liée à l'abondance d'un des composés actifs. Également, il a été suggéré que l'activité antibactérienne des composants majoritaires peut être modulée par la présence de ceux minoritaires, et par conséquent, contribuer à l'effet interactif final de l'huile totale. Par ailleurs, les HEs ont le pouvoir de perturber les membranes cellulaires et les membranes cytoplasmiques des champignons et des bactéries. Mais non seulement grâce à leur composition complexe, mais aussi au fait que leurs composants peuvent agir sur de nombreux sites cellulaires particuliers [214].

La teneur des HEs étudiées en ces molécules corrèle avec leur activité antibactérienne dévoilée. En effet, la teneur de l'HE d'*O. compactum*, en carvacrol et en thymol qui sont des phénols connus par leur pouvoir antimicrobien considérable confirme son efficacité. L'HE d'*O. majorana* est riche en 4-thujanol et en terpinen-4-ol, deux alcools aussi connus par leur effet antimicrobien. Pour le *P. asperum*, le citronellol, le geraniol et le formate de citronellyl qui sont les composés majoritaires, ont déjà montré leur effet antibactérien contre différentes souches [215]. En revanche, l'efficacité spécifique observée contre les souches représentant le Gram positif peut être renforcée par l'étude menée sur le citronellol qui est le composé le plus abondant dans l'huile du géranium, et qui a montré son effet contre les Gram positifs, *S. aureus* et *E. faecalis* et non contre ceux négatifs, *E. coli* et *P. aeruginosa* [94].

L'effet antibactérien modéré observé chez le myrte, la lavande, l'armoise, les feuilles du bigaradier, pourrait être associée à leurs teneurs en plusieurs molécules, qui sont des éthers, des esters et des cétones connus par leur effet antibactérien inférieur à celui des phénols et des alcools [18], [73]. Cependant les huiles du zest du bigaradier et celle d'ormenie ont été les huiles les plus faibles à cause de leur teneur élevée en terpènes hydrocarbonés. La forte activité antibactérienne du serpolet, qui fait l'exception malgré sa teneur en composés non oxygénés, pourrait être liée au thymol et au p-cymène qui procèdent un fort effet antibactérien [218]. Ainsi, l'effet synergique qui pourrait être produit par l'interaction du thymol avec le γ -terpinène et le p-cymène fonctionnant comme des monoterpènes d'hydrocarbures s'explique par le fait qu'ils facilitent la pénétration du thymol [30]. En effet, le p-cymène et le thymol ont déjà montré un effet antifongique synergique [219]. En outre, les trois principaux composés du *T. serpyllum*

ont le même mécanisme d'action contre les bactéries, en fait, ils diminuent les températures de fusion des lipides des membranes, ce qui augmente la fluidité membranaire [220].

Tableau 17: les CMI des HEs étudiées

Plantes \ Souches	CMI % (v/v)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>O. mixta</i>	2	2	*	*
<i>C. aurantium</i> Zest	2	*	*	*
<i>A. herba-alba</i>	0,125	1	2	*
<i>M. spicata</i>	0,25	1	1	>4
<i>C. aurantium</i> Feuilles	1	1	2	*
<i>L. dentata</i>	0,125	1	4	>4
<i>M. communis</i>	0,5	1	4	*
<i>P. asperum</i>	0,031	1	>4	>4
<i>O. majorana</i>	0,125	0,25	0,25	2
<i>T. serpyllum</i>	0,125	0,25	0,125	>4
<i>O. compactum</i>	0,031	0,125	0,062	>4

3. Concentration minimale bactéricide

Le tableau (18) représente les CMB des HEs étudiées. Cette entité peut être mieux exploitée en utilisant le rapport CMB / CMI qui traduit la capacité bactéricide ou bactériostatique de chaque HE. Dans notre étude, un effet bactéricide aussi que bactériostatique ont été produits contre les quatre souches bactériennes, vu que le rapport CMB/CMI a été inférieure à 2 et supérieur à 2 respectivement. Une différence non-spécifique ni au Gram ni au huile a été observée. Selon la littérature, l'effet bactéricide de l'HE de l'*O. compactum* a été déjà mis en évidence par Bouhdid *et al* [112] contre dix souches bactériennes dont trois sont de *S. aureus* et deux de *E. coli*, cependant qu'ils n'ont pas pu définir la CMB de *P. aeruginosa*. L'huile d'*O. majorana* a été montrée comme huile bactériostatique plus qu'une huile bactéricide contre plusieurs souches [129], [221]. Concernant l'huile du *T. serpyllum*, Nikolic *et al* [134] l'ont démontrée bactéricide contre *P. aeruginosa*, *E. feacalis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *L. acidophilus*, *S. pyogenes* et *S. aureus*. L'HE de *P. asperum* a été démontrée bactéricide contre les Gram positive, tant qu'elle avait un caractère bactériostatique contre les Gram négative[181]. L'huile du myrte a été bactéricide contre plus que vingt souches d'*Acinetobacter baumannii*, une d' *E. coli* et une de *S. aureus* [169]. Quatre chemotypes de l'HE d'*A. herba-alba* ont été testées par l'équipe de Mighri, contre plusieurs souches. Un caractère bactériostatique a été obtenu avec les quatre différentes compositions chimiques[157]. Concernant les autres plantes étudiées, peu d'étude s'ont été intéressées à ce paramètre.

Tableau 18: les CMB des HEs étudiées

Souches Plantes	CMB% (v/v)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>O. mixta</i>	2	2	*	*
<i>C. aurantium</i> Zest	2	*	*	*
<i>A. herba-alba</i>	2	2	>4	*
<i>M. spicata</i>	0,5	>2	1	>4
<i>C. aurantium</i> Feuilles	1	>2	>2	*
<i>L. dentata</i>	0,5	1	>4	*
<i>M. communis</i>	2	2	>4	*
<i>P. asperum</i>	1	2	>2	>2
<i>O. majorana</i>	2	2	0,25	>4
<i>T. serpyllum</i>	0,5	0,25	0,25	>4
<i>O. compactum</i>	0,062	0,125	0,125	>4

Tableau 19: Caractère bactéricide ou bactériostatique des HEs

Souches Plantes	<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CMB/CMI	Caractère	CMB/CMI	Caractère	CMB/CMI	Caractère	CMB/CMI	Caractère
<i>O. mixta</i>	1	Bactéricide	1	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	-
<i>C. aurantium</i> Zest	1	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	Bactériostatique	-	-
<i>A. herba-alba</i>	16	Bactériostatique	2	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	-
<i>M. spicata</i>	2	Bactéricide	-	Bactériostatique	1	Bactéricide	-	-
<i>C. aurantium</i> Feuilles	1	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	Bactériostatique	-	-
<i>L. dentata</i>	4	Bactériostatique	1	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	-
<i>M. communis</i>	4	Bactériostatique	2	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	-
<i>P. asperum</i>	32,26	Bactériostatique	2	Bactéricide	-	Bactériostatique	-	-
<i>O. majorana</i>	16	Bactériostatique	8	Bactériostatique	1	Bactéricide	-	Bactériostatique
<i>T. serpyllum</i>	4	Bactériostatique	1	Bactéricide	2	Bactéricide	-	-
<i>O. compactum</i>	2	Bactéricide	1	Bactéricide	2,02	Bactéricide	-	-

IV- Conclusion :

Il ressort de notre présente étude systématique qu'il existe des HEs ayant un effet antibactérien prometteur, ces huiles présentent différents degrés d'activités antibactériennes et confirment l'hypothèse posée suivant leurs compositions chimiques.

Les trois Lamiaceae : origan, marjolaine et serpolet ont révélé une intéressante activité antibactérienne. Cela a été confirmé par les valeurs de la CMI et la CMB qui ont aussi mis en évidence la haute sensibilité de *B. subtilis*, à la fois, la résistance de *P. aeruginosa*.

Il est par ailleurs important de souligner que cette propriété doit être bien exploitée dans différents domaines : alimentaire, pharmaceutique, cosmétique...Cela a été bien orienté par les études menées sur les interactions des HEs utilisées comme additifs. En effet, plusieurs

chercheurs ont exploité l'effet des interactions produites avec les combinaisons des HEs avec d'autre huile ainsi que d'autre molécule (antibiotique, enzyme, protéine...). Raison pour laquelle nous allons consacrer les deux chapitres suivant à évaluer l'effet antibactérien combinatoire des HEs étudiées.

Chapitre III : Activité antibactérienne : Mélange binaire

I. Introduction

L'utilisation des HEs comme alternatives protectrices de l'environnement pour lutter contre les microorganismes pathogènes devient une tendance mondiale [84], [222]. En fait, plusieurs recherches ont évalué leurs effets contre les bactéries alimentaires, et même plusieurs HEs ont été testées dans le fromage [72], la viande [223], et le riz [224]. Cependant, les études sur les interactions des HEs avec la matrice alimentaire ont été acceptées [76]. En fait, des concentrations élevées ont été demandées pour obtenir un effet antibactérien similaire à celui obtenu avec des essais *in vitro* [29], [116] ce qui peut conduire à dépasser leurs doses toxiques et à modifier la qualité organoleptique des aliments [29], [30], [220]. Par conséquent, de nombreux chercheurs étudient le potentiel antibactérien des HEs se concentrent sur leurs combinaisons et interactions, et tentent de bénéficier de leurs résultats synergiques et augmenter leur efficacité. Actuellement, des effets antibactériens synergiques et additifs ont été observés entre de nombreuses HEs, Comme *Origanum vulgare* et *Rosmarinus officinalis*, *Lippia multiflora* et *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus* et *Cymbopogon giganteus*[77].

Ce chapitre vise à évaluer l'effet antibactérien combinatoire binaire des HEs en utilisant la méthode de Damier. Une méthode très utilisée par plusieurs auteurs [76], [79], [82], [84] où la synergie, l'absence d'interaction et l'antagonisme peuvent être facilement détectés [225].

II. Matériel et méthodes :

1. Méthode de Damier (Chackerboard)

Les effets antibactériens des combinaisons des HE contre les souches bactériennes ont été évaluées en utilisant la méthode de Damier (chackerboard) [83]. Dans cet essai, des dilutions de chaque deux huiles ont été préparées dans du MHB complété avec de l'agar bactériologique (0,15% p / v). Le long de l'axe des x (1-11) à travers la plaque, 50 μ L de chaque concentration de la 1^{ère} HE ont été ajoutés dans chaque puits de la première au 11^{ème} puits. Ainsi, l'axe des ordonnées (A-E), 50 μ L de chaque concentration de la 2^{ème} HE ont été ajoutés dans chaque puits. Le puits 12-A a été considéré comme contrôle de la croissance.

L'inoculum bactérien a ensuite été ajouté dans tous les puits pour obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/mL. La plaque de 96 puits a été ensuite scellée et incubé à 37 ° C pendant 18-20 h. Après incubation, 10 μ l de résazurine ont été ajoutés à chaque puits pour évaluer la

croissance bactérienne. Après une incubation supplémentaire à 37 ° C pendant 2 h, les valeurs de l'indice CIF ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$\sum ICIF = CIF(A) + CIF(B)$$

Où

$$CIF (A) = \frac{CMI (A) \text{ en combinaison}}{CMI (A) \text{ seul}}$$

Et

$$CIF (B) = \frac{CMI (B) \text{ en combinaison}}{CMI (B) \text{ seule}}$$

Les interprétations des valeurs de $\sum ICIF$: ≤ 0.5 = synergie; $0.5-0.75$ = partial synergie; $0.76-1.0$ = additivité; $>1.0-4.0$ = indifférence (non-interactive); > 4.0 = antagonisme, [226]

2. Combinaisons binaires

Quatre combinaisons ont été choisies pour être étudiées. Celles-ci ainsi que les concentrations à tester ont été déterminées selon la sensibilité de chaque souche vis-à-vis des huiles. Le tableau (20) présente les combinaisons testées sur chaque souche, et les nombres k et k' présentant la concentration de l solution mère de chaque huile dans chaque combinaison.

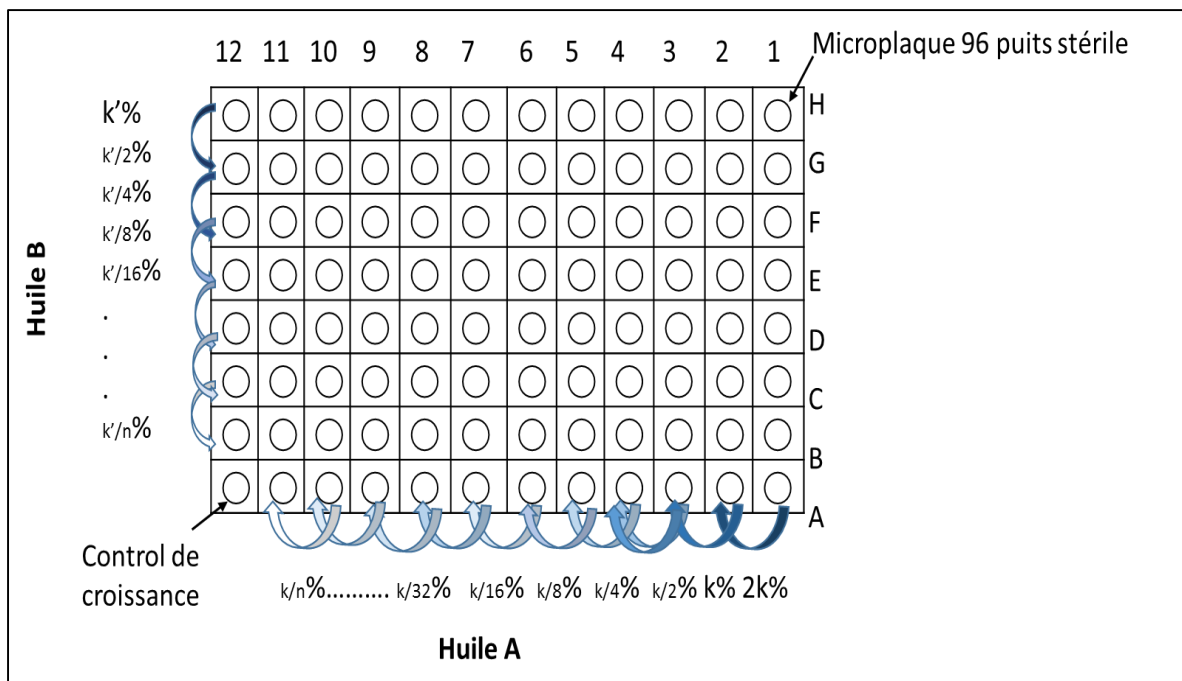


Figure 14: Schéma descriptif de la méthode déterminant le CIF indice

Tableau 20 : k et k' des différentes combinaisons réalisées

Souches	combinaisons	k/k'
<i>B. subtilis</i>	<i>C. aurantium zest/ C. aurantium feuilles</i>	4/8
	<i>O. majorana / T. serpyllum</i>	2/2
	<i>P. asperum/ O. mixta</i>	0,5/8
	<i>O. majorana/ L. dentata</i>	1/1
<i>S. aureus</i>	<i>P. asperum/ O. mixta</i>	4/8
	<i>O. majorana/ L. dentata</i>	1/1
	<i>O. majorana / T. serpyllum</i>	4/4
<i>E. coli</i>	<i>O. majorana/ L. dentata</i>	1/8
	<i>O. majorana / T. serpyllum</i>	4/16
<i>P. aeruginosa</i>	<i>O. majorana / T. serpyllum</i>	8/32

III. Résultats et discussion :

1. Mélange binaire 1 : *Origanum majorana/Thymus serpyllum*

a. *Bacillus subtilis*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *T. serpyllum* sur *B. subtilis* est présenté sur le tableau (21).

Les indices de CIF ont variés entre 0,62 et 0,75. Deux combinaisons ont révélé une synergie partielle, (1/4CMI marjolaine ; 1/2 CMI serpolet) (1/2 CMI marjolaine ; 1/8 CMI serpolet).

Tableau 21: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *T. serpyllum* contre *B. subtilis*

Huile essentielle	CMI seule (v/v)	%	CMI combinaison % (v/v)	CIF	indice de CIF	Type d'interaction
<i>O. majorana</i>	0.125		0.0312	0,249	0.75	Synergie partielle
<i>T. serpyllum</i>	0.125		0.0625	0.5		
<i>O. majorana</i>	0.125		0.0625	0.5	0.62	Synergie partielle
<i>T. serpyllum</i>	0.125		0.0156	0.1248		

b. *Staphylococcus aureus*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *T. serpyllum* sur *S. aureus* est présenté sur le tableau (22).

Une synergie partielle a été le résultat obtenu des interactions entre l'HE d'*O. majorana* et celle de *T. serpyllum* contre *S. aureus*, La combinaisons du 1/4 de la CMI de la marjolaine et du 1/2 de la CMI du serpolet, ainsi du 1/2 de la CMI de la marjolaine + 1/4 de la CMI de serpolet ont montré leurs capacité de réduire la CMI des deux huiles étudiées avec un indice CIF de 0,75.

Tableau 22: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *T. serpyllum* contre *S. aureus*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>T. serpyllum</i>	0.25	0.125	0.5	0.75	Synergie partielle
<i>O. majorana</i>	0.25	0.0625	0.25		
<i>T. serpyllum</i>	0.25	0.0625	0.25	0.75	Synergie partielle
<i>O. majorana</i>	0.25	0.125	0.5		

c. *Escherichia coli*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *T. serpyllum* sur *E. coli* est présenté sur le tableau (23).

Seule une combinaison de 1/2 marjolaine CMI + 1/4 de serpolet CMI a montré un effet antibactérien contre *E. coli*

Tableau 23: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *T. serpyllum* contre *E. coli*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>T. serpyllum</i>	0.125	0.0625	0.5	0.75	Synergie partielle
<i>O. majorana</i>	0.25	0.0625	0.25		

d. *Pseudomonas aeruginosa*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *T. serpyllum* sur *P. aeruginosa* est présenté sur le tableau (24).

L'indice de CIF a varié entre 0,625 et 0,725 révélant deux combinaisons produisant une synergie partielle : (1/8 CMI marjolaine+1/2 CMI serpolet) et (1/2 CMI marjolaine +1/8 CMI serpolet).

Tableau 24: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *T. serpyllum* contre *P. aeruginosa*.

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>O. majorana</i>	2	0.25	0.125	0.625	Synergie partielle
<i>T. serpyllum</i>	16	8	0,5		
<i>O. majorana</i>	2	1	0.5	0.725	Synergie partielle
<i>T. serpyllum</i>	16	2	0.125		

Plusieurs études ont utilisé l'huile de la marjolaine ou du serpolet dans des combinaisons pour évaluer le type d'interaction et l'effet antibactérien produit, mais aucune n'a testé leur effet combiné. L'HE d'*O. majorana* a été combinée par Gutierrez *et al* [76] à celle d'*O. vulgare*, à celle d'*O. basilicum*, à celle de *R. officinalis*, et celle de *S. triloba*, un effet antibactérien additif a été obtenu de ces quatre formules. Cependant, cette huile a donné place un effet antifongique antagoniste une fois mélangé avec l'huile de *Juniperus communis*[227]. Sa combinaison avec Piperacillin, Ampicillin, Cefazolin, Carbenicillin, Cefuroxime n'a abouti à aucune interaction[84]. En revanche, à notre connaissance, le serpolet n'a fait le sujet d'aucune combinaison antibactérienne.

2. Mélange binaire 2 : *Origanum majorana*/ *Lavandula dentata*

a. *Bacillus subtilis*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *L. dentata* contre *B. subtilis* est présenté sur le tableau (25). Les indices de CIF ont variés entre 0,62 et 1. La première combinaison a révélé une synergie partielle, (1/2CMI_{marjolaine} ; 1/4 CMI_{lavande}) et la deuxième a révélé un effet additif (1/2 CMI_{marjolaine} ; 1/2 CMI_{lavande}).

Tableau 25: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *L. dentata* contre *B. subtilis*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>O. majorana</i>	0.125	0.0625	0,5	0,625	Synergie partielle
<i>L. dentata</i>	0,5	0.0625	0,125		
<i>O. majorana</i>	0.125	0,0625	0,5	1	Additivité
<i>L. dentata</i>	0,5	0,25	0,5		

b. *Staphylococcus aureus*

Le résultat des interactions entre *O. majorana* et *L. dentata* sur *S. aureus* est présenté sur le tableau (26). Les résultats de l'effet combiné binaire entre l'HE d'*O. majorana* et celle de *L. dentata* ont montré que la combinaison (1/2 CMI *Marjolaine* + 1/8 CMI *lavande*) induit un effet synergique partiel contre *S. aureus* avec un indice FIC de 0,625. La deuxième combinaison (1/2 CMI *Marjolaine* + 1/2 CMI *lavande*) a affiché un effet additif avec un indice CIF de 1

Tableau 26 : Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *L. dentata* contre *S. aureus*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>L. dentata</i>	1	0.125	0.125	0.625	Synergie partielle
<i>O. majorana</i>	0.25	0.125	0.5		
<i>L. dentata</i>	1	0.5	0.5	1	Additive
<i>O. majorana</i>	0.25	0.125	0.5		

c. *Escherichia coli*

En ce qui concerne l'effet combiné contre *E. coli*, deux combinaisons de 1/2 CMI *marjolaine* + 1/4 CMI *lavande* et 1/4 de CMI *marjolaine* + 1/2 CMI *lavande* ont montré un effet antibactérien synergique partiel avec un indice CIF de 0,75 (Tableau 27)

Tableau 27: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. majorana* et de *L. dentata* contre *E. coli*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>L. dentata</i>	4	1	0.25	0.75	Partial synergie
<i>O. majorana</i>	0.25	0.125	0.5		
<i>L. dentata</i>	4	2	0.5	0.75	Partial synergie
<i>O. majorana</i>	0.25	0.0625	0.25		

Comme toute combinaison citée dans ce manuscrit, la combinaison de l'HE de la marjolaine avec celle de la lavande blanche n'a jamais été testée pour évaluer son effet antibactérien combinatoire. En outre, *L. dentata*, n'a jamais été combinée ni à une HE, ni à un antibiotique. En récompense, la Lavande anglaise (*L. angustifolia*) a été combiné d'abord à la marjolaine qui

a produit un effet antagoniste contre *S. aureus*, et un effet synergique contre *P. aeruginosa* [228], en suite, à plus que quarante autres HEs, où il a montré un effet synergique avec *T. vulgaris*, *Juniperus virginiana*, *Citrus sinensis*, *Daucus carot*, et *Cinnamomum zeylanicum*.

3. Mélange binaire 3 : *Pelargonium asperum*/*Ormenis mixta*

a. *Bacillus subtilis*

Le résultat des interactions entre *P. asperum* et *O. mixta* sur *B. subtilis* est présenté sur le tableau (28). Une combinaison (1/2 MIC *P. asperum* + 1/256 MIC *O. mixta*) a présenté un effet synergique, avec un indice FIC de 0,50. Les combinaisons.

Tableau 28: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE d'*O. mixta* et de *P. asperum* contre *B. subtilis*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>P. asperum</i>	0.031	0.015	0.5	0.50	Synergie
<i>O. mixta</i>	2	0.007813	0.0039		

b. *Staphylococcus aureus*

Le résultat des interactions entre *P. asperum* et *O. mixta* sur *S. aureus* est présenté sur le tableau (29). Deux combinaisons (1/2 MIC *P. asperum* + 1/256 MIC *O. mixta* et 1/2 MIC *P. asperum* + 1/128 MIC *O. mixta*) ont présenté un effet synergique, avec un indice FIC de 0,50. Les combinaisons (1/2 MIC *P. asperum* + 1/64 MIC *O. mixta* et 1/2 MIC *P. asperum* + 1/32 MIC *O. mixta*) ont montré une synergie partielle avec l'indice FIC de 0,51 et 0,53 respectivement.

Tableau 29: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison d'HE d'*O. mixta* et de *P. asperum* contre *S. aureus*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
<i>P. asperum</i>	1	0.5	0.5	0.50	Synergie
<i>O. mixta</i>	2	0.007813	0.0039		
<i>P. asperum</i>	1	0.5	0.5	0.50	Synergie
<i>O. mixta</i>	2	0.015625	0.007813		
<i>P. asperum</i>	1	0.5	0.5	0.51	Synergie partielle
<i>O. mixta</i>	2	0.0313	0.015625		
<i>P. asperum</i>	1	0.5	0.5	0.53	Synergie partielle
<i>O. mixta</i>	2	0.0626	0.0313		

4. Mélange binaire 4 : *Citrus aurantium* Feuilles/*Citrus aurantium* Zest

a. *Bacillus subtilis*

Le résultat des interactions entre *C. aurantium* feuilles et *C. aurantium* zest sur *B. subtilis* est présenté sur le tableau (30).

Les valeurs d'indice de CIF de la combinaison des deux HEs d'agrumes varient de 0,25 à 1,12. La combinaison (1/4 CMI_{feuilles} + 1/128 CMI_{zest}) a présenté un effet synergique remarquable contre *B. subtilis* avec un indice CIF de 0,25. Ainsi, la combinaison (1/2 CMI_{feuilles} + 1/256 CMI_{zest}) présente une activité inhibitrice vis-à-vis la souche testée avec un indice CIF de 0,50 indiquant une interaction synergique partielle.

Les autres combinaisons ont maintenu l'effet inhibiteur avec un indice FIC de 1,125 et 1,06 indiquant l'absence d'interaction. En d'autres termes, toutes les applications combinées testées entre les deux HEs n'ont présenté aucune interaction antagoniste. Il est impératif de souligner que la combinaison optimale réduit la valeur de la CMI de l'HE de *C. aurantium* feuilles à un quart, ce qui est un aspect important de la valorisation de cette HE obtenue à faible rendement par rapport à celle du zeste.

Tableau 30: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et résultat de l'interaction de la combinaison de l'HE des feuilles et celle du zest de *C. aurantium* contre *B. subtilis*

Huile essentielle	CMI seule % (v/v)	CMI combinaison % (v/v)	CIF	CIF indice	Type d'interaction
Feuilles	1	0,5	0,5	0,50	Synergie partielle
Zest	2	0,007813	0,0039		
Feuilles	1	0,25	0,25	0,25	Synergie
Zest	2	0,015625	0,007813		
Feuilles	1	0,125	0,125	1,12	Indifférence
Zest	2	2	1		
Feuilles	1	0,06	0,06	1,06	Indifférence
Zest	2	2	1		

5. Discussion générale des mélanges binaires :

Généralement, l'interaction entre les composés des deux huiles lors de la combinaison oriente l'effet antibactérien à obtenir. En effet, ces interactions peuvent produire quatre types de résultats : indifférence, additivité, antagonisme et synergie.

Même si de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'effet antimicrobien des HEs, jusqu'à présent leur mécanisme d'action n'est pas entièrement compris. En revanche, il existe certains

mécanismes d'interaction antibactérienne typiquement acceptés, et qui produisent un résultat synergique : l'inhibition séquentielle d'une voie biochimique commune, l'inhibition d'enzymes protectrices, La combinaison d'agents actifs sur la paroi cellulaire, et l'utilisation d'agents actifs sur la paroi cellulaire pour améliorer l'absorption d'autres antimicrobiens [229].

L'HE du *T. serpyllum* et celle d'*O. majorana* ont été classé parmi les huiles les plus actives sur *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cela, nous a mené à évaluer leur effet combinatoire binaire contre ces souches.

La combinaison de l'huile du serpolet et de la marjolaine a produit une synergie partielle contre les quatre souches étudiées. Cette combinaison a été déjà testée contre *L. monocytogenes*, par contre, aucune différence dans l'effet inhibiteur n'a été observée par rapport à l'effet de chaque huile seule. Ainsi, aucune explication basée sur la composition chimique n'a été rapportée [71].

Le résultat obtenu dans cette étude, peut être principalement le produit de l'interaction de leurs composés majoritaires : Le p-cymène, le γ -terpinène, le thymol, le 4-thujanol, et le terpinène-4-ol. En effet l'interaction entre les monoterpènes alcools et les monoterpènes hydrocarbures a été déjà rapportée par plusieurs auteurs. Le synergisme produit de ce mélange a été expliqué par la capacité des hydrocarbures de perméabiliser la paroi cellulaire, et faciliter par conséquence, la pénétration des alcools dans la cellule bactérienne. Ultee et al. [218] ont démontré un effet synergique entre le carvacrol et le p-cymène et ils ont suggéré que cet effet se produit lorsque le p-cymène permet au carvacrol d'entrer plus facilement dans la cellule. Cependant, il est nécessaire de noter que l'étude de la combinaison de γ -terpinène et de p-cymène avec le (-) - terpinène-4-ol a conduit à un effet antagoniste significatif contre *E. coli*. Les auteurs ont suggéré que cet effet peut être dû à une diminution de la solubilité du terpinène-4-ol dans le milieu aqueux une fois combiné avec le γ -terpinène et le p-cymène [230].

La combinaison entre *L. dentata* et *O. majorana* et une combinaison entre une huile à effet antibactérien moyen contre trois souches, et une huile très active riche en alcools. Avec cette combinaison, l'effet inhibiteur a changé suivant les proportions de chaque huile pour *B. subtilis* et *S. aureus* (Gram positif), et on a obtenu donc une synergie partielle et une additivité d'effet antibactérien. Cependant, qu'une synergie partielle a été obtenue contre *E. coli* (Gram négatif).

Plusieurs interactions semblent être possibles dans cette combinaison, celles qui tendent vers être similaire au résultat obtenu par Van Vuuren et son équipe [231] qui ont montré la capacité du 1,8 cineol de produire une synergie ou une additivité lorsqu'il est en combinaison avec des

hydrocarbures, comme le limonène et l'aromadendrène. Il est supposé aussi que le β -pinène (monoterpène hydrocarboné) entraîne une augmentation de l'absorption du (-) - terpinène-4-ol et du trans-4-thujanol (alcool monoterpénique) dans la paroi cellulaire. Les mêmes mécanismes pourront toujours expliquer l'effet synergique constaté avec la combinaison *d'O. mixta* et *P. asperum*.

L'HE du zest de *C. aurantium* n'a été active que contre *B. subtilis*, pour sa mise en valeur, une combinaison, avec celle des feuilles riche en alcool mais faible en rendement, a été réalisée.

L'effet combiné antibactérien des HEs de feuilles et du zeste de fruit du *C. aurantium* n'a pas été rapporté précédemment. Tandis que Sonboli *et al*[232] ont montré que le linalool présente un effet antibactérien élevé par rapport au limonène et que ces deux composés n'ont aucune interaction antagoniste, ce qui est en accord avec nos résultats. L'effet synergique entre les deux HEs étudiées pourrait s'expliquer par la capacité des hydrocarbures monoterpènes à faciliter la pénétration des monoterpènes oxygénés (celui de l'HE des feuilles) dans la cellule en interagissant la membrane cellulaire. De plus, d'autres rapports ont montré que des combinaisons de l'hydrocarbure monoterpénique (α -pinène) avec le limonène ou le linalool ont montré des effets additifs et synergiques [80].

IV. Conclusion :

Quatre combinaisons binaires d'HE ont été testées. La 1^{ère} composée de l'huile *d'O. majorana* et de celle du *T. serpyllum*. Ces deux HEs ont été actives sur les quatre souches étudiées, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ce qui a permis de tester leur combinaison sur les quatre les germes. Un effet antibactérien synergique partiel a été obtenu contre toutes les souches. La 2^{ème} combinaison a été composée de l'HE *d'O. majorana* et de *L. dentata*, cette dernière a été active juste sur *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*, ce qui a permis de tester leur combinaison sur ces trois germes. Un effet antibactérien additif et partiellement synergique a été obtenu. La 3^{ème} combinaison a été composée de l'HE de *P. asperum* et *d'O. mixta*. Ces deux huiles ont été actives sur les souches Gram positive. Cette combinaison nous permis d'obtenir un effet antibactérien synergique contre les deux souches. La 4^{ème} combinaison a été formulée de l'HE des feuilles et celle du zest du fruit de *C. aurantium*. La deuxième huile a été active juste sur *B. subtilis*, ce qui a permis de tester cette combinaison juste sur cette souche. Deux formules assurant un effet antibactérien synergique ont été obtenues. En total, vingt formulations ont possédé un effet antibactérien meilleur que celui de l'HE seule.

Théoriquement parlant, et si on fait appel au tableau (2), cette méthode si populaire chez les bactériologistes et les mycologues, est également susceptible de poser des problèmes de reproductibilité à cause des interprétations discordantes par l'indice de CIF. Pour ces raisons, il n'est pas rationnel pour les auteurs de faire des interprétations à grande échelle des données issues des expériences. Hors que, d'autre méthode sont recommandées pour confirmer les résultats déjà obtenus. En faisant appel à des protocoles rigoureux, fiables et standardisés se basant sur des études randomisées de haut niveau de preuve scientifique.

Chapitre IV : Activité antibactérienne : Mélange ternaire (Plan de mélange)

I. Introduction

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'interaction antimicrobienne entre les HEs. Dans le test du damier, l'interaction est évaluée par le calcul de l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire [77], [80]. En outre, la méthode de cinétique de l'effet bactéricide (time-kill test), souvent utilisée pour distinguer les effets bactériostatiques / bactéricides et les effets dépendant du temps / dépendant de la concentration[81]. Néanmoins, ces deux méthodes ne pouvaient pas toujours définir le mélange optimal des HEs.

La conception des plans de mélange est une classe des expériences de la surface de réponse, dans laquelle les variables indépendantes sont les proportions des composants à étudier [101]. La variable dépendante (réponse) dépend uniquement des proportions des composants du mélange [101]. Les études de conception de mélange visent non seulement à élaborer des formulations meilleures ou innovantes offrant des réponses optimales, mais aussi à créer des conceptions générales sur les réponses et les interactions entre facteurs indépendants[233].

Le présent chapitre, élabore une nouvelle conception de formulation des HEs pour évaluer leur effet antimicrobien combinatoire ternaire, basée sur la détermination des CMI des formules établies par un plan de mélange centré augmenté. Une méthode, qui, à notre connaissance, n'a pas été signalée précédemment.

II. Matériel et méthodes :

1. Etablissement des expériences

La formulation ternaire des HE s'est basée sur le plan de mélange centré augmenté (Augmented Simplex-centroid design).

Ce plan a été réalisé avec le logiciel NemrodW, sans contraintes, avec randomisation. Les différentes expériences à réaliser sont représentées par un triangle équilatéral (figure 15). Les différentes formulations programmées sont : Les sommets du triangle (1 ; 2 ; 3) correspondent aux huiles pures, les centres des arêtes correspondent aux mélanges moitié-moitié de deux huiles pures (4 ; 5 ; 6) et le centre de gravité du triangle correspond au mélange contenant un tiers de chaque huile pure (7). Ce plan est augmenté par les centres de gravités des quatre simplex unitaires. Bien que le centre de gravité d'un des simplex est occupé par le point central,

il reste à ajouter trois points (8 ; 9 ; 10) pour construire le plan de mélange centré augmenté. Les facteurs présentent les ratios de chaque huile dans chaque formule, et varient entre 0 et 100%. Le tableau (31) présente le ratio de chaque huile dans chaque formulation.

Tableau 31: Teneur en HEs dans les différentes expériences

N° d'expérience	Huile1	Huile 2	Huile 3
1	100%	-	-
2	-	100%	-
3	-	-	100%
4	50%	50%	-
5	50%	-	50%
6	-	50%	50%
7	33%	33%	33%
8	66,67%	16,67%	16,67%
9	16,67%	66,67%	16,67%
10	16,67%	16,67%	66,67%

Chaque point (1-10) correspond à une expérience qui a été exécutée en testant l'effet antibactérien de chaque combinaison. La conception expérimentale complète pour chaque bactérie est composée de 18 expériences : Trois réplifications du point central, et deux pour les autres expériences. Les réponses ont été quantifiées sous forme de CMI.

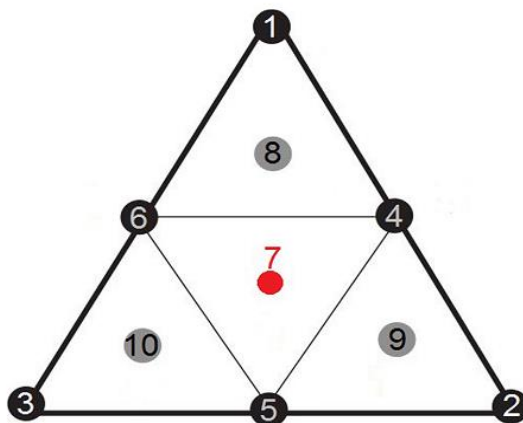


Figure 15 : Expériences à réalisées dans un plan de mélange centré augmenté

2. Préparation des mélanges :

Dans des tubes Eppendorf de 2mL, l'émulsifiations de chaque formule a été réalisés dans du MHB supplémenté de 0,15% d'agar, où on ajoute le ratio de chaque HE suivant le tableau (30) sur le bouillon, on ferme le tube et on homogénéise le tout au vortex.

3. Les CMI des mélanges

Dans une microplaque 96puits, une série de dilution est réalisée à partir de la solution mère de chacune des dix formulations pour un volume finale de 100µL dans chaque puits. Ensuite, 100µL de l'inoculum bactérien de concentration finale de 10^6 UFC/mL sont ajoutés aux différentes concentrations des séries de dilution. Après incubation à 37 ° C pendant 18h, 5 µL de résazurine est ajoutés à chaque puits comme indicateur de la croissance bactérienne. Après une incubation à 37 ° C pendant 2 h, la croissance bactérienne a été révélée par le changement de coloration du violet au rose. La valeur MIC est déterminée comme étant la plus faible concentration qui empêche un changement de couleur de la résazurine. Le test a été répliqué 3 fois pour chaque mélange.

4. Etudes statistiques

Les données ont été soumises à une analyse statistique via deux logiciel SAS JMP 8.0.1 et STATISTICA 8, et le meilleur modèle a été choisi pour chaque réponse. La fonction de désirabilité ainsi que le profileur de mélange ont été exécutés afin de déterminer les optimums

Trois modèles mathématiques peuvent décrire la relation entre la réponse et les facteurs :

- ✓ Modèle linéaire de premier degré, traduit par l'équation :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$$

- ✓ Modèle quadratique modèle de 2^{ème} degré, dont l'équation est :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3$$

- ✓ Modèle spécial cubique de 3^{ème} degré, dont l'équation est :

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

Où :

Y : la réponse globale du mélange ;

Xi : les proportions du composant (i) dans le mélange ;

b_i : l'amplitude de l'effet de chaque composant X_i ;

b_{ij} : l'ampleur de l'effet d'interaction de deux composants ;

b_{ijk} : l'ampleur de l'effet d'interaction des trois composants de la réaction.

III. Résultats et discussion :

1. Mélange 1 : *Origanum compactum*/*Origanum majorana*/*Thymus serpyllum*

1.1. Réponses

La matrice adoptée pour la formulation et les réponses de toutes les expérimentations appliquant les HEs d'*O. compactum*, *O. majorana* et *T. serpyllum* seules ou leurs différentes combinaison sont représentées sur le tableau (32). Les essais ont été réalisés après randomisation.

Tableau 32: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange1 contre B subtili

N° d'expérience	Huiles essentielles (%) v			CMI (%) v/v		
	O. compactum	O. majorana	T. serpyllum	B. subtilis	S. aureus	E. coli
1	100	0	0	0.03125	0.125	0.0625
2	16,67	16,67	66,67	0.0625	0.0625	0.25
3	50	50	0	0.25	0.25	0.0625
4	0	100	0	0.125	0.25	0.25
5	0	0	100	0.125	0.25	0.125
6	66,67	16,67	16,67	0.0625	0.03125	0.125
7	33,33	33,33	33,33	0.0625	0.03125	0.125
8	0	50	50	0.125	0.0625	0.25
9	16,67	66,67	16,67	0.125	0.125	0.25
10	50	0	50	0.125	0.125	0.125
11	100	0	0	0.03125	0.125	0.0625
12	0	100	0	0.125	0.25	0.25
13	0	0	100	0.125	0.25	0.125
14	50	50	0	0.25	0.25	0.0625
15	50	0	50	0.125	0.125	0.125
16	0	50	50	0.125	0.0625	0.25
17	33,33	33,33	33,33	0.0625	0.03125	0.125
18	33,33	33,33	33,33	0.0625	0.03125	0.125

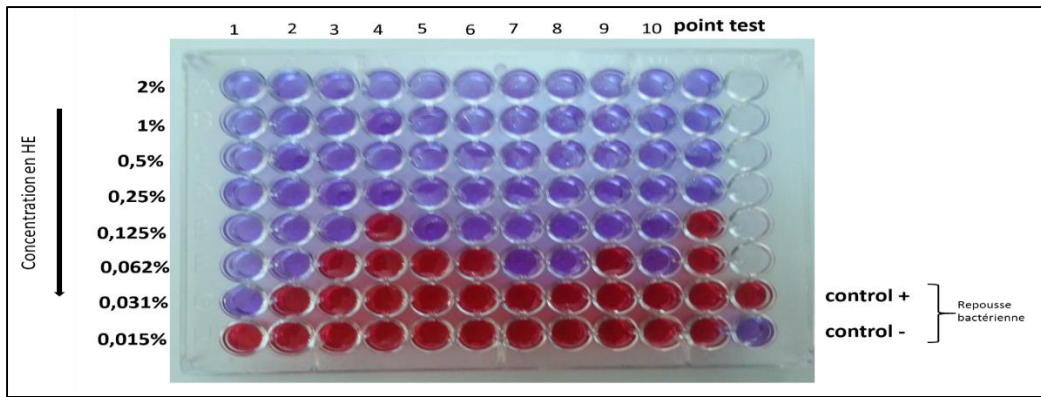


Figure 16: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche *B. subtilis*

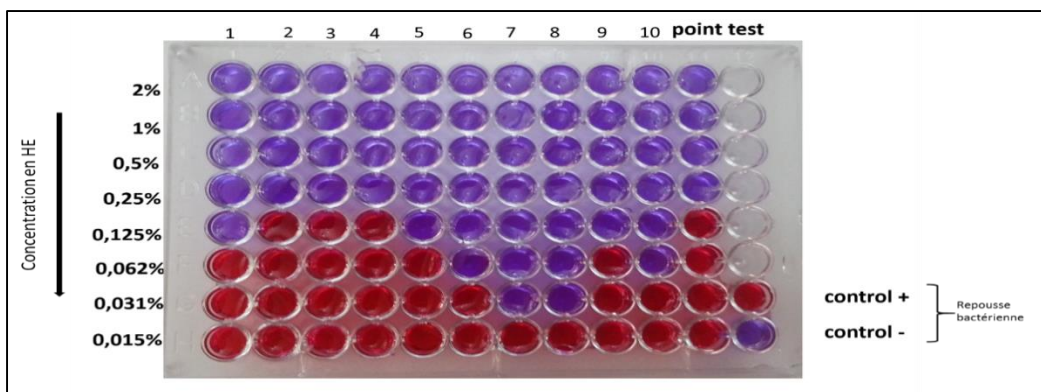


Figure 17: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche *S. aureus*

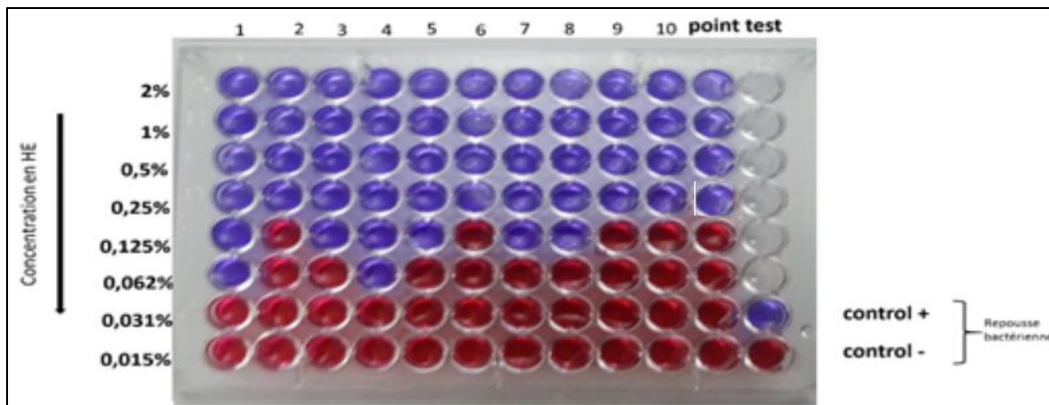


Figure 18: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 1 sur la souche *E. coli*

1.2. Validation statistique du modèle postulé

1.2.1. *Bacillus subtilis*

D'après le tableau (33) de l'analyse de la variance, la probabilité de la signification du risque p -value inférieure à 0,05 permet de conclure que l'effet principale de la régression est significatif. Ainsi, Le coefficient de détermination $R^2=98\%$ témoigne la bonne corrélation

entre les valeurs observées et les valeurs prévues par le modèle mathématique. La figure (19), illustre cette corrélation, en montrant l'allure droite des valeurs expérimentales.

Tableau 33: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche *B. subtilis*

Source de la variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Régression	6	0,06360221	0,010600	90,7464	<,0001*
Résidus	11	0,00128494	0,000117		
Total	17	0,06488715			
R ²	98,00				
R ² ajustée	97,00				

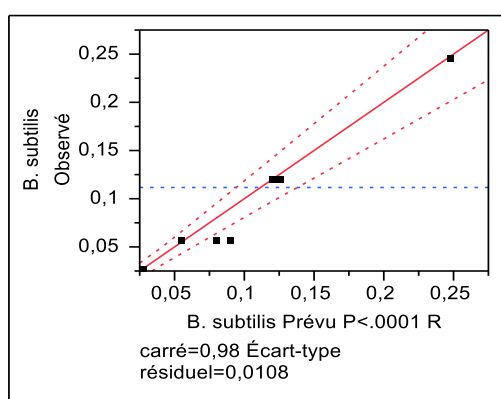


Figure 19: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche *B. subtilis*

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

D'après le tableau (34) de l'analyse de la variance, la probabilité de la signification du risque *p-value* inférieure à 0,05 prouve que l'effet principale de la régression est significatif. Le coefficient de détermination $R^2 = 97\%$ est satisfaisant. Il montre que le modèle adapté concorde considérablement avec les valeurs observées. Cela est confirmé par la figure (20) qui montre l'allure droite de la courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

Tableau 34: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche *S. aureus*

Source de variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Modèle	6	0,13459090	0,022432	60,4635	<,0001*
Résidus	11	0,00408097	0,000371		
Total	17	0,13867188			
R carré	0,97				
R carré ajusté	0,95				

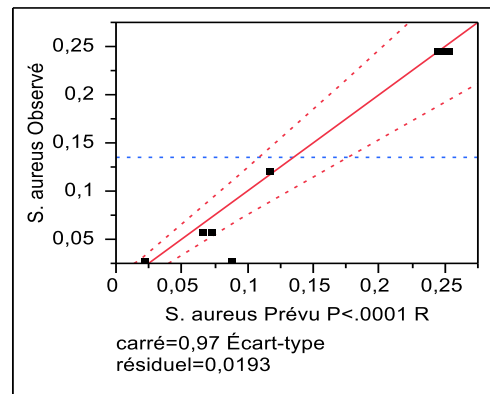


Figure 20: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche *S. aureus*

1.2.3. *Escherichia coli*

D'après le tableau (35) de l'analyse de la variance, la probabilité de la signification du risque *p-value* est inférieure à 0,05, raison pour laquelle on assure que l'effet principale de la régression est significatif. Le coefficient de détermination $R^2=0,86\%$ représentant l'allure de la courbe des valeurs observées en fonction des valeurs calculées par le modèle établi, est acceptable pour décrire le phénomène étudié. La figure (21) représente la courbe des valeurs observées en fonction des valeurs calculées décrites.

Tableau 35: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 1 contre la souche *E. coli*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Modèle	6	0,08261613	0,013769	11,7687	0,0003*
Résidus	11	0,01286999	0,00117		
Total	17	0,09548611			
R^2	0,86				
R^2 ajusté	0,79				

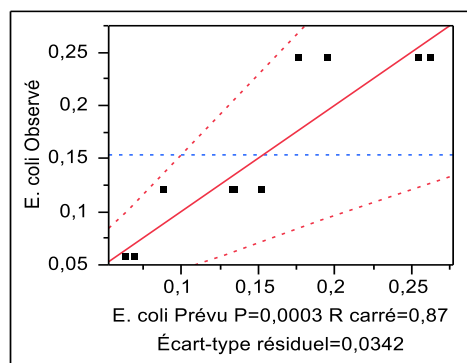


Figure 21: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 1 correspondant à la souche *E. coli*

1.3. Etude statistique des résidus

Le tableau (36) présente les valeurs des résidus calculés par la différence entre les valeurs de CMI mesurées et celles calculées par les modèles établis. Une différence négligeable a été observée sur toutes les valeurs enregistrées.

Tableau 36: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées par le mélange 1 contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*

N°Exp	<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	Y_{exp}	Y_{calc}	Résidu	Y_{exp}	Y_{calc}	Résidu	Y_{exp}	Y_{calc}	Résidu
1	0,03	0,02673	0,00327	0,125	0,117	0,008	0,062	0,0635	-0,0015
2	0,03	0,02673	0,00327	0,125	0,117	0,008	0,062	0,0635	-0,0015
3	0,125	0,12643	-0,00143	0,25	0,2531	-0,0031	0,25	0,2546	-0,0046
4	0,125	0,12643	-0,00143	0,25	0,2531	-0,0031	0,25	0,2546	-0,0046
5	0,125	0,12323	0,00177	0,25	0,2499	0,0001	0,125	0,1327	-0,0077
6	0,125	0,12323	0,00177	0,25	0,2499	0,0001	0,125	0,1327	-0,0077
7	0,25	0,24815	0,00185	0,25	0,2451	0,0049	0,062	0,0681	-0,0061
8	0,25	0,24815	0,00185	0,25	0,2451	0,0049	0,062	0,0681	-0,0061
9	0,125	0,11995	0,00505	0,125	0,1169	0,0081	0,125	0,1342	-0,0092
10	0,125	0,11995	0,00505	0,125	0,1169	0,0081	0,125	0,1342	-0,0092
11	0,125	0,12466	0,00034	0,062	0,0651	-0,0031	0,25	0,2623	-0,0123
12	0,125	0,12466	0,00034	0,062	0,0651	-0,0031	0,25	0,2623	-0,0123
13	0,062	0,05476	0,00724	0,03	0,0202	0,0098	0,125	0,1527	-0,0277
14	0,062	0,05476	0,00724	0,03	0,0202	0,0098	0,125	0,1527	-0,0277
15	0,062	0,05476	0,00724	0,03	0,0202	0,0098	0,125	0,1527	-0,0277
16	0,062	0,08888	-0,02688	0,03	0,0878	-0,0578	0,125	0,0883	0,0367
17	0,125	0,12368	0,00132	0,125	0,1159	0,0091	0,25	0,1947	0,0553
18	0,062	0,07987	-0,01787	0,062	0,0721	-0,0101	0,25	0,1761	0,0739

1.4. Estimations des coefficients

1.4.1. *Bacillus subtilis*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (37). D'après ce tableau, tous les coefficients sont statistiquement significatifs, sauf le b₂₃ qui traduit l'absence de l'effet de l'interaction entre l'HE d'*O. majorana* et celle de *T. serpyllum* sur ce mélange.

Tableau 37 : Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre *B. subtilis*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	t-student	<i>p-value</i>
<i>O. compactum</i>	b ₁	0,0279605	0,0075	3,73	0,0033*
<i>O. majorana</i>	b ₂	0,126398	0,0075	16,85	<,0001*
<i>T. serpyllum</i>	b ₃	0,1232731	0,0075	16,44	<,0001*
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i>	b ₁₂	0,6837171	0,037292	18,33	<,0001*
<i>O. compactum</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₁₃	0,1774671	0,037292	4,76	0,0006*
<i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₂₃	-0,000658	0,037292	-0,02	0,9862
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₁₂₃	-3,588162	0,23062	-15,56	<,0001*

1.4.2. *Staphylococcus aureus*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (38). D'après ce tableau, tous les coefficients sont statistiquement significatifs.

Tableau 38: Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre *S. aureus*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	p-value
<i>O. compactum</i>	b ₁	0,1171053	0,013367	8,76	<,0001*
<i>O. majorana</i>	b ₂	0,2530428	0,013367	18,93	<,0001*
<i>T. serpyllum</i>	b ₃	0,2499178	0,013367	18,7	<,0001*
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i>	b ₁₂	0,2402961	0,066459	3,62	0,0041*
<i>O. compactum</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₁₃	-0,265954	0,066459	-4	0,0021*
<i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₂₃	-0,744079	0,066459	-11,2	<,0001*
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b ₁₂₃	-2,694086	0,410996	-6,56	<,0001*

1.4.3. *Escherichia coli*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (39). D'après ce tableau, tous les

coefficients sont statistiquement significatifs sauf le b_{13} et le b_{123} , ce qui indique que l'interaction entre l'HE d'*O. compactum* et celle du *T. serpyllum* n'a pas été significative, ainsi que l'effet antibactérien ternaire des trois huiles étudiées.

Tableau 39: Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs pour le mélange 1 contre *E. coli*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	p-value
<i>O. compactum</i>	b_1	0,0639802	0,023737	2,70	0,0208*
<i>O. majorana</i>	b_2	0,2546052	0,023737	10,73	<,0001*
<i>T. serpyllum</i>	b_3	0,1327302	0,023737	5,59	0,0002*
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i>	b_{12}	-0,362829	0,118022	-3,07	0,0106*
<i>O. compactum</i> * <i>T. serpyllum</i>	b_{13}	0,143421	0,118022	1,22	0,2497
<i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b_{23}	0,274671	0,118022	2,33	0,0401*
<i>O. compactum</i> * <i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b_{123}	-0,106571	0,729869	-0,15	0,8866

1.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D

Les modèles mathématiques obtenus pour *B. subtilis*, *S. aureus*, et *E. coli* sont respectivement représentés par les équations (Eq1), (Eq2) et (Eq3).

$$Y = 0,0279605 \times O_c + 0,126398 \times O_m + 0,123273 \times T_s + 0,683717 \times O_c O_m + 0,177467 \times O_c T_s - 3,58816 \times O_c O_m T_s \text{ Eq: 1}$$

$$Y = 0,0279605 \times O_c + 0,126398 \times O_m + 0,123273 \times T_s + 0,683717 \times O_c O_m + 0,177467 \times O_c T_s - 0,000657843 \times O_m T_s - 3,58816 \times O_c O_m T_s \text{ Eq: 2}$$

$$Y = 0,117105 \times O_c + 0,253043 \times O_m + 0,249918 \times T_s + 0,240296 \times O_c O_m + 0,744079 \times O_m T_s \text{ Eq: 3}$$

La figure (22) illustre la représentation 2D avec les courbes d'isoreponse et celle de 3D représentant les différentes activités envisagées pour les différentes formulations pouvant être réalisées avec les trois huiles étudiées. Sur cette figure, les interactions synergiques et antagonistes sont plus claires.

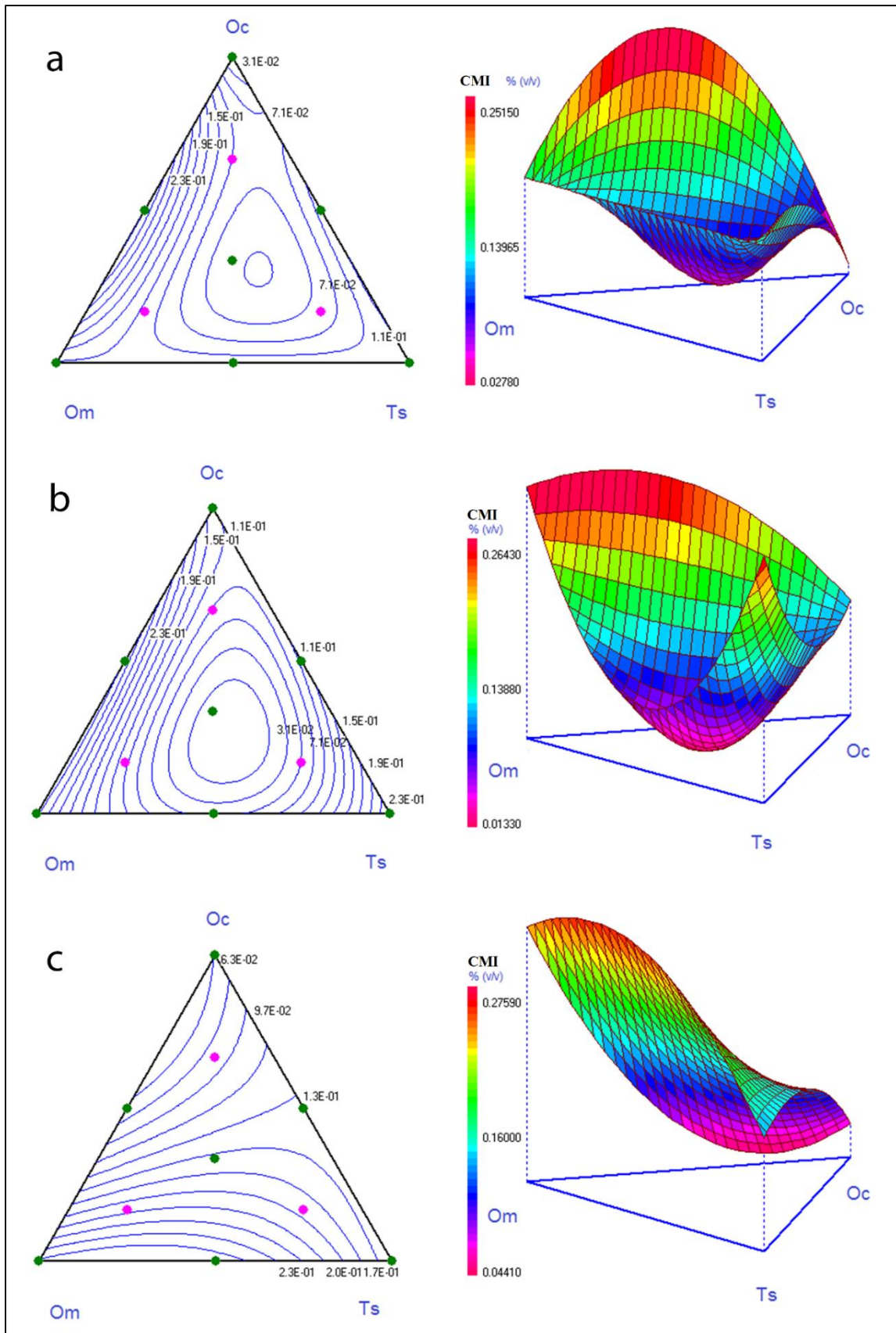


Figure 22: Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange 1

1.6. Point-Test

Pour finaliser les tests de la validité des modèles retenus, nous avons eu recours à l'outil point test. Les figures 16,17 et 18 présentent le résultat du point test de chaque souche. Les coordonnées de la formulation tester contre *B. subtilis* et *S. aureus* sont $X_{O.compactum} = 0,4$ et $X_{O.majorana} = 0,6\%$. Cette formule a donné une CMI de 0,25% comme réponse, ainsi, la réponse prédite par le modèle n'a pas dépassé 0,24%, ce qui montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les réponses expérimentales et celles prédites.

Concernant le point-test évalué contre *E. coli*, une formule constituée de 60% de marjolaine et 40 de serpolet a révélé une CMI de 0,25%. La réponse mathématiquement prédite pour cette formulation n'a pas dépassé les 0,27%, ainsi, on obtient une différence non-significative entre les 2 réponses.

1.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

L'objectif de cette partie est de trouver la formulation optimale des trois constituants utilisés qui mène à une CMI qui renseigne sur une sensibilité très haute.

1.7.1. *Bacillus subtilis*

D'après la figure (23) qui présente le profileur de mélange, nous pouvons envisager les différentes activités relatives aux différentes proportions des trois huiles utilisées dans le mélange 1. Une CMI inférieure à 0,06% a été fixée comme compromis contre *B. subtilis*. Notamment, la zone rose cerne l'ensemble des formules ayant la concentration souhaitée.

Par ailleurs, le choix de la CMI optimale se base sur l'étude de désirabilité schématisé par la figure (24). Cette étude a fixé la CMI la plus basse à une concentration de 0,027%, qui peut être obtenue avec l'huile d'*O. compactum* seule, ainsi, la désirabilité atteint 97%.

En conclusion, L'HE d'*O. compactum* riche en carvacrol, γ -terpinène et en thymol, a été l'huile la plus efficace contre *B. subtilis*.

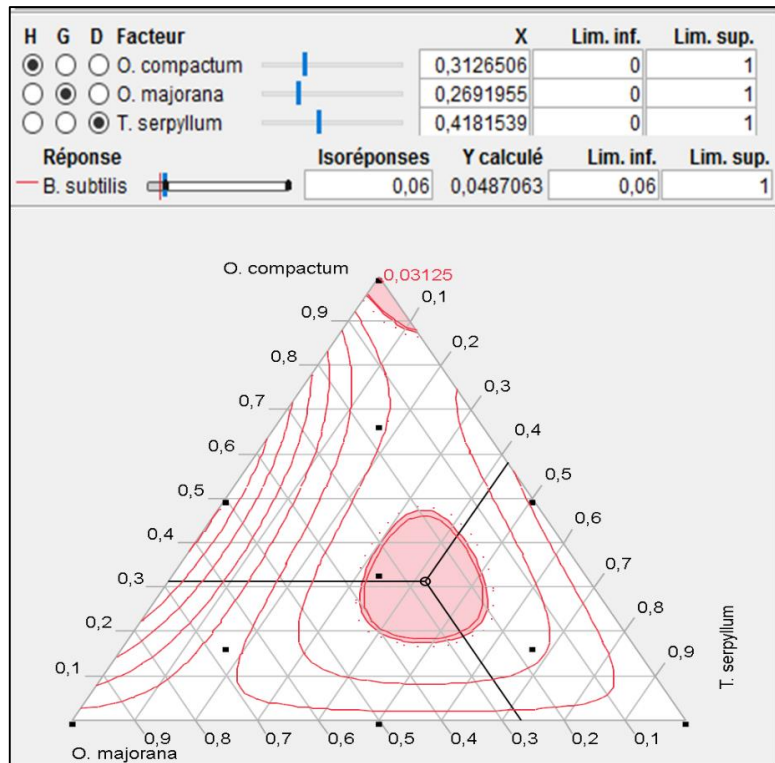


Figure 24: Profileur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de *B. subtilis*

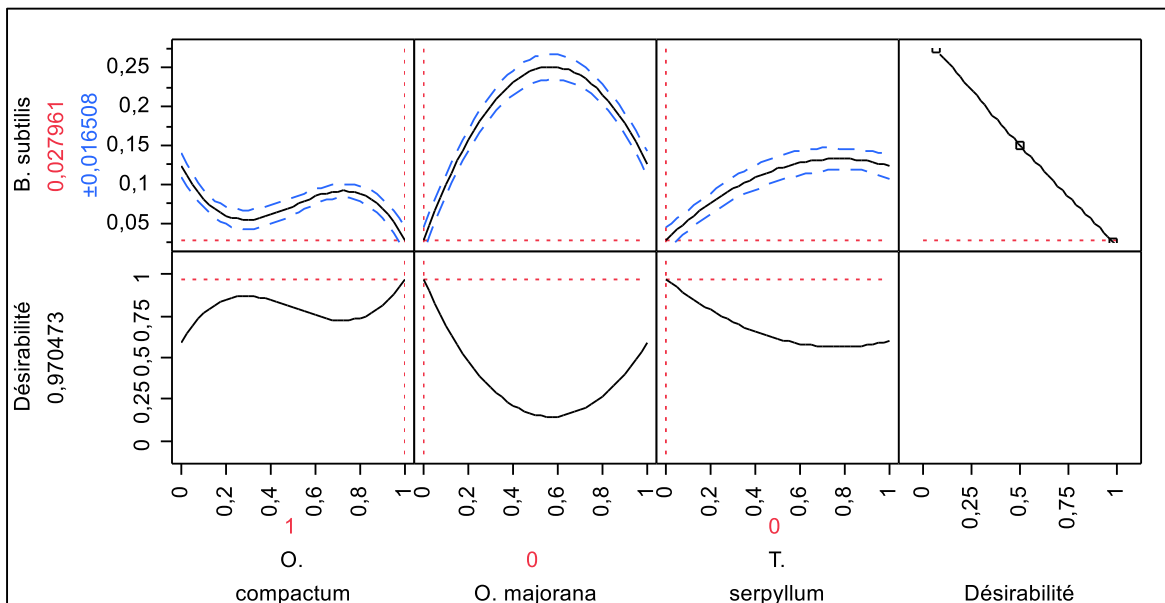


Figure 23: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre *B. subtilis*

1.7.2. *Staphylococcus aureus*

Comme dans le cas de la souche précédente, le profileur de mélange représenté par la figure (25) illustre sur la zone rose les formules prédites à donner une CMI de *S. aureus* inférieure à 0,06%.

L'étude de la désirabilité qui a pour objectif de minimiser la CMI, est illustrée par la figure (26). Cette dernière montre que la plus basse valeur peut atteindre 0,013% avec une désirabilité de 98% en assurant un mélange aux proportions suivantes :

- ✓ une proportion de l'HE d'*O. compactum* égale à 23% ;
- ✓ une proportion de l'HE d'*O. majorana* égale à 32% ;
- ✓ une proportion de l'HE de *T. serpyllum* égale à 44% .

L'association de ces trois huiles, avec les ratios exigés par le model, a fait ressortir une nouvelle composition chimique responsable de l'effet antibactérien obtenu. Ce mélange en huiles est composé principalement en : p-cymene 21,90%, thymol 19,09%, γ -terpinene 12,02%, carvacrol 11,01%, terpinene-4-ol 9,32% et en 4-thujanol 7,86%.

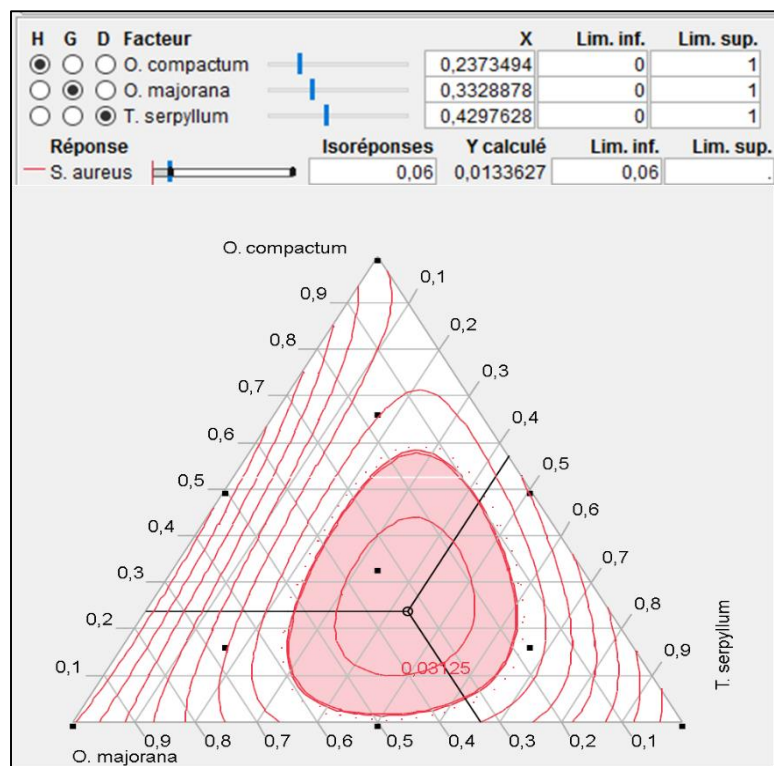


Figure 25: Profilur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de *S. aureus*

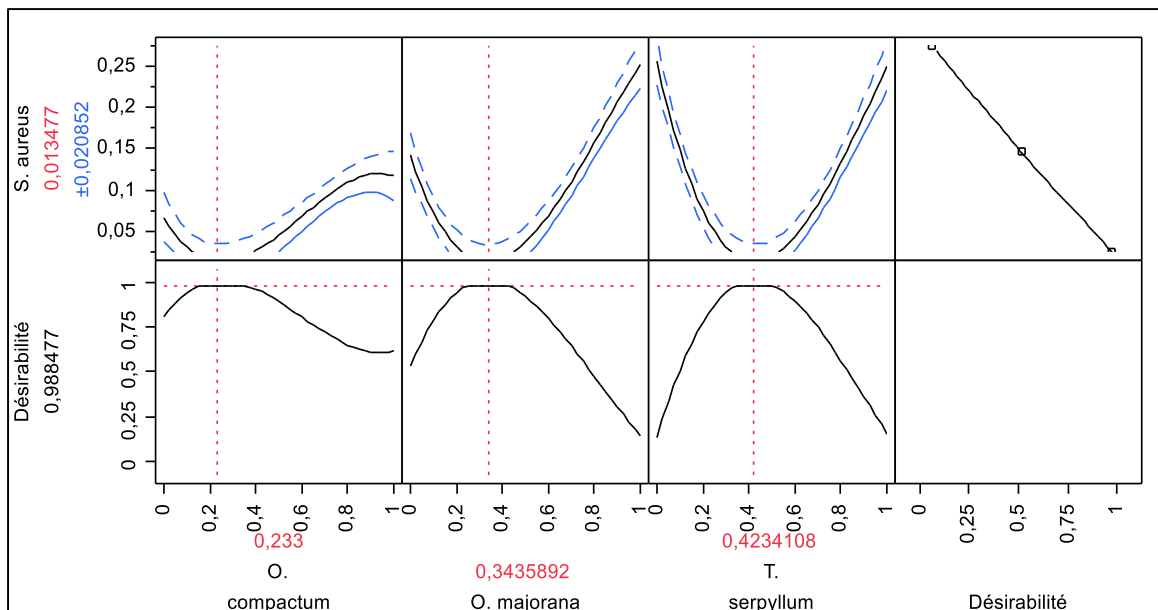


Figure 26: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre *S. aureus*

1.7.3. *Escherichia coli*

D'après le profileur de mélange (figure 27), et d'une façon analogue aux résultats obtenus pour les deux souches précédentes. La zone rose présente les formulations prédites à donner une CMI inférieure à 0,06%.

La formule optimale obtenue à l'aide de l'étude de la désirabilité a été constituée de deux HEs. En effet, la préparation d'un mélange de 75% de l'HE d'*O. compactum* et 25% de celle d'*O. majorana* prédit une CMI de 0,04%.

Contrairement au Gram positive, la composition chimique obtenue avec le mélange des huiles est marquée par l'abondance du carvacrol 35,89 % suivi par le thymol 17,96% et le γ -terpinene 12,94%, puis le p-cymene 9,49%, terpinene-4-ol 7,28%, et 4-thujanol 6,14%.

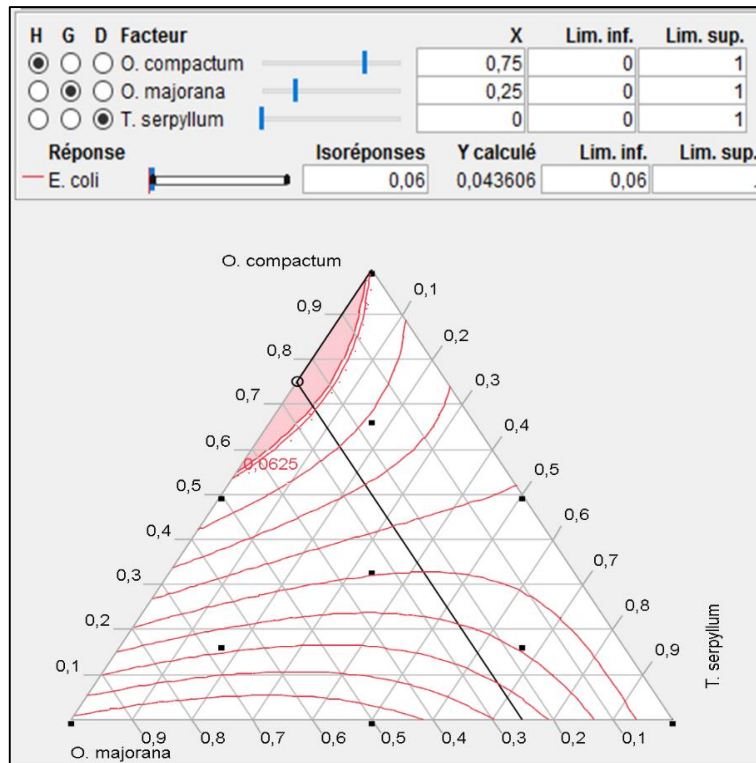


Figure 27: Profilur du mélange 1 pour la réponse CMI=0,06 de *E. coli*

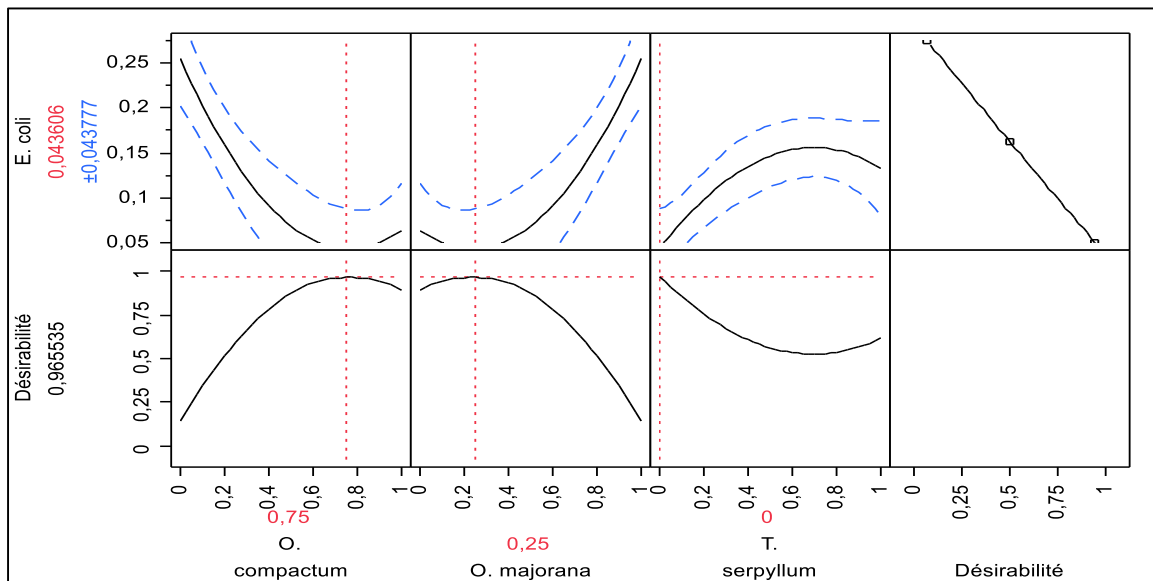


Figure 28: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 1 contre *E. coli*.

1.8. Optimisation de formulation multiple

L'optimisation de la formulation nous a donné la composition des CMI les plus faibles contre les trois souches, a mené à définir le mélange formé de 0,31 d'origan, 0,23 de marjolaine et 0,46 de serpolet, une CMI de 0,09%, 0,02% et 0,16% contre, respectivement, *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*.

2. Mélange 2: *Origanum majorana*/*Thymus serpyllum*/*Mentha spicata*

2.1. Réponses

La matrice adoptée pour la formulation et les réponses de toutes les expérimentations appliquant les HEs d'*O. majorana*, *T. serpyllum* et *M. spicata* seules ou leurs différentes combinaison sont représentées sur le tableau (40). Les essais ont été réalisés après randomisation.

Tableau 40: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 2

N°d'expérience	Huiles essentielles (%) v			CMI (%) v/v			
	O. majorana	T. serpyllum	M. spicata	B. subtilis	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa
1	50	0	50	0,5	0,5	0,25	8
2	100	0	0	0,125	0,25	0,25	4
3	0	0	100	0,25	1	4	16
4	0	100	0	0,125	0,25	0,125	16
5	33,33	33,33	33,33	0,5	0,5	0,5	16
6	0	50	50	0,5	0,5	0,25	16
7	0	50	50	0,5	0,5	0,25	16
8	50	50	0	0,125	0,0625	0,25	8
9	100	0	0	0,125	0,25	0,25	4
10	50	50	0	0,125	0,0625	0,25	8
11	50	0	50	0,5	0,5	0,25	8
12	0	0	100	0,25	1	4	16
13	33,33	33,33	33,33	0,5	0,5	0,5	16
14	0	100	0	0,125	0,25	0,125	16
15	16,67	66,67	16,67	0,5	0,25	0,25	16
16	16,67	16,67	66,67	0,5	0,5	1	16
17	33,33	33,33	33,33	0,5	0,5	0,5	16
18	66,67	16,67	16,67	0,5	0,25	0,25	8

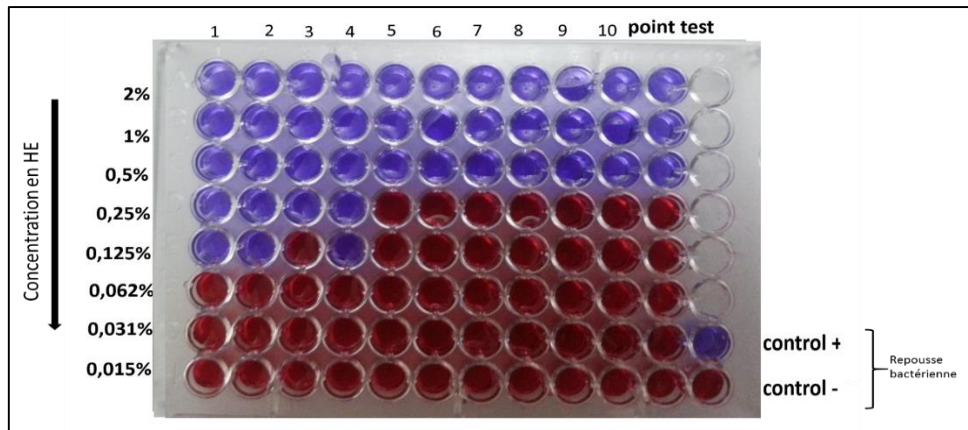


Figure 29: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche *B. subtilis*.

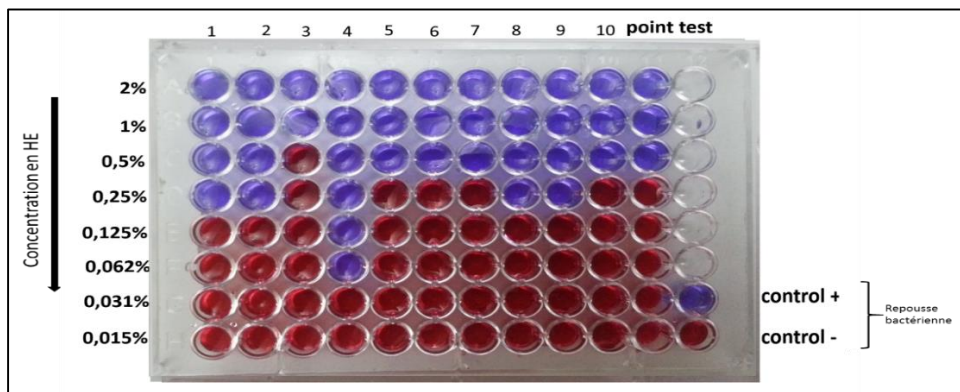


Figure 30: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche *S. aureus*.

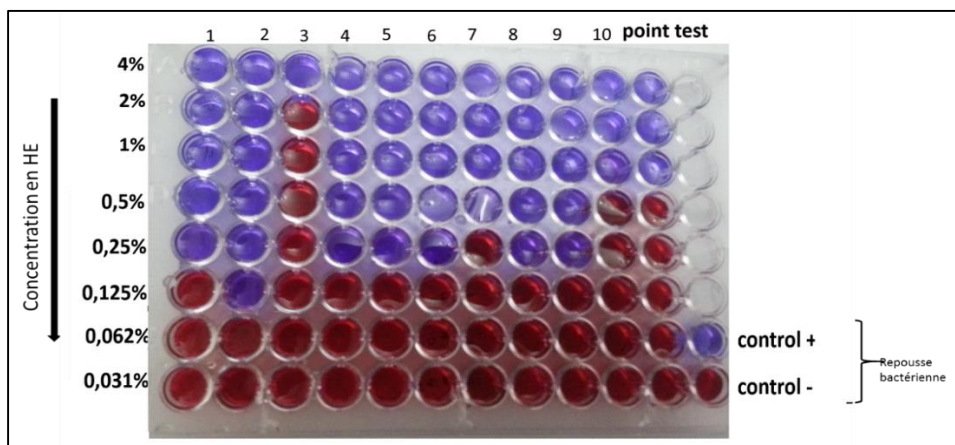


Figure 31: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche *E. coli*.

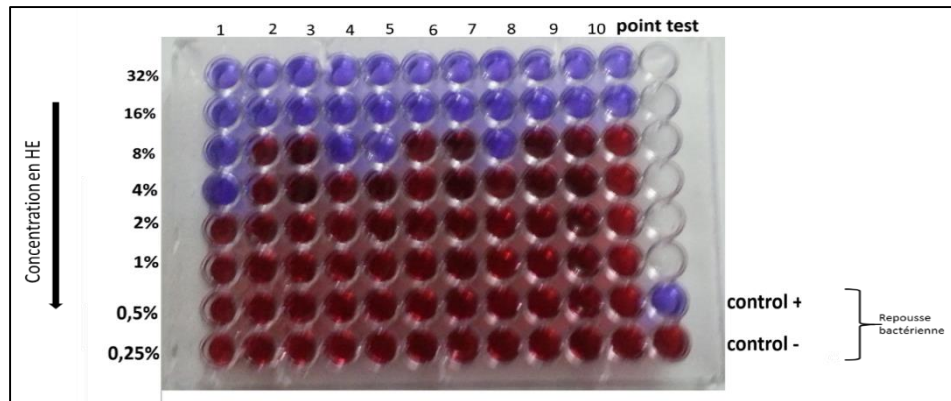


Figure 32: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisés avec le mélange 2 sur la souche *P. aeruginosa*.

2.2. Validation statistique du modèle postulé

2.2.1. *Bacillus subtilis*

Les résultats mentionnés sur le tableau (41) de l'analyse de la variance indiquent que l'effet principal de la régression est significatif vu que la probabilité de la signification du risque *p-value* est inférieure à 0,05. Le coefficient R^2 est égal à 93%, cette valeur reflète la corrélation entre les valeurs expérimentales et celles prévues par le modèle adapté. Cette entité est plus expliquée par la figure (33) représentant l'allure de la courbe des valeurs expérimentales en fonction de celles mesurées.

Tableau 41: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre *B. subtilis*

Source de variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Modèle	6	0,51045363	0,085076	24,5255	<,0001*
Résidus	11	0,03815748	0,003469		
Total	17	0,54861111			
R^2	0,93				
R^2 ajusté	0,89				

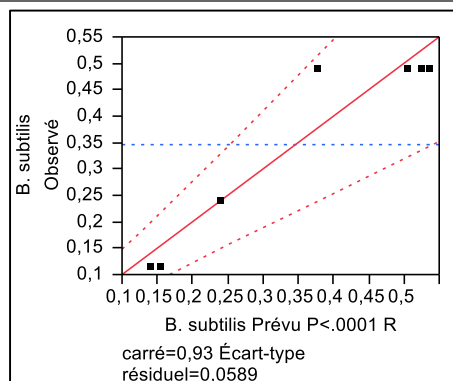


Figure 33 : Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2 correspondant à la souche *B. subtilis*

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

D'après le tableau (42) de l'analyse de variance, L'effet principal de la régression est assuré significatif, vu que la valeur de la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0,05. Le coefficient de détermination R^2 équivalu à 0,96 traduit l'allure droite de la courbe des valeurs expérimentales en fonction de celles mesurées représentée par la figure (34), et elle témoigne la bonne corrélation existante entre ces valeurs.

Tableau 42: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre *S. aureus*

Source de variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p-value
Modèle	6	1,1083285	0,184721	45,7135	<,0001*
Résidus	11	0,0444493	0,004041		
Total	17	1,1527778			
R^2	0,96				
R^2 ajusté	0,94				

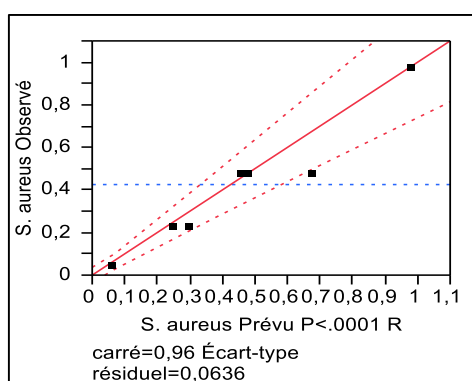


Figure 34: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche *S. aureus*

2.2.3. *Escherichia coli*

Les données illustrées sur le tableau (43) de l'analyse de la variance démontre la signification de l'effet de la régression linéaire par une probabilité de la signification de risque p -value qui est inférieure à 0,05. Le R^2 est exceptionnellement satisfaisant pour décrire la bonne concordance entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle adapté. L'allure de la courbe obtenue pour ce modèle est représentée par la figure (35).

Tableau 43: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre *E. coli*

Source de variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p-value
Modèle	6	24,475969	4,07933	253,7925	<,0001*
Résidus	11	0,176808	0,01607		
Total	17	24,652778			
R carré	0,99				
R carré ajusté	0,98				

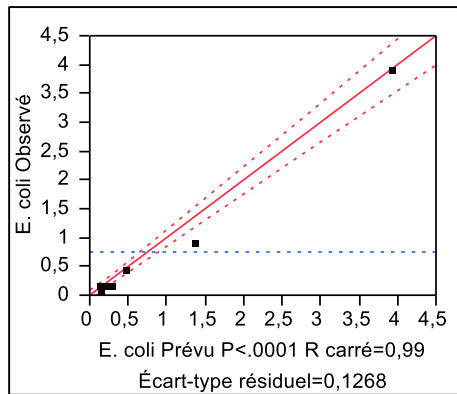


Figure 35: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche *E. coli*

2.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

D’après le tableau (44) de l’analyse de la variance, la probabilité de la signification de risque *p-value* qui est inférieure à 0,05 prouve la significativité de l’effet de la régression linéaire. Le coefficient de détermination R^2 qui atteint 0,99 représente la bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle adapté. L’allure de la courbe obtenue pour ce modèle est représentée par la figure (36).

Tableau 44: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 2 contre *P. aeruginosa*

Source de variance	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Modèle	6	379,26547	63,2109	589,7693	<,0001*
Résidus	11	1,17897	0,1072		
Total	17	380,44444			
R carré	0,99				
R carré ajusté	0,99				

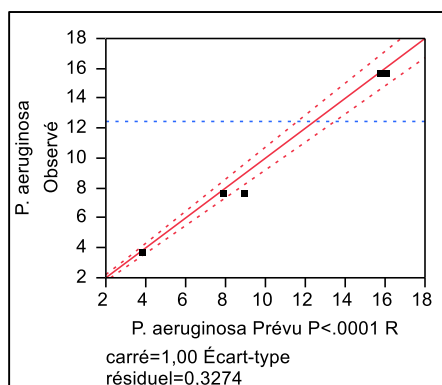


Figure 36: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange 2, correspondant à la souche *P. aeruginosa*

2.3. Etude statistique des résidus

Le tableau (45), représente les résidus calculés pour les 4 souches, des différences négligeables ont été observées.

Tableau 45: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées pour le mélange 2 contre *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*

N°Exp	<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	Y _{exp}	Y _{calc}	Résidu	Y _{exp}	Y _{calc}	Résidu	Y _{exp}	Y _{calc}	Résidu	Y _{exp}	Y _{calc}	Résidu
1	0,03	0,027	0,003	0,25	0,25	0,000	0,062	0,064	-0,002	4	4,116	-0,116
2	0,03	0,027	0,003	0,25	0,25	0,000	0,062	0,064	-0,002	4	4,116	-0,116
3	0,125	0,126	-0,001	0,25	0,25	0,000	0,25	0,255	-0,005	16	15,516	0,484
4	0,125	0,126	-0,001	0,25	0,25	0,000	0,25	0,255	-0,005	16	15,516	0,484
5	0,125	0,123	0,002	1	0,978	0,022	0,125	0,133	-0,008	4	4,116	-0,116
6	0,125	0,123	0,002	1	0,978	0,022	0,125	0,133	-0,008	4	4,116	-0,116
7	0,25	0,248	0,002	0,063	0,063	0,000	0,062	0,068	-0,006	8	7,631	0,369
8	0,25	0,248	0,002	0,063	0,063	0,000	0,062	0,068	-0,006	8	7,631	0,369
9	0,125	0,120	0,005	0,5	0,478	0,022	0,125	0,134	-0,009	8	8,231	-0,231
10	0,125	0,120	0,005	0,5	0,478	0,022	0,125	0,134	-0,009	8	8,231	-0,231
11	0,125	0,125	0,000	0,5	0,478	0,022	0,25	0,262	-0,012	32	31,631	0,369
12	0,125	0,125	0,000	0,5	0,478	0,022	0,25	0,262	-0,012	32	31,631	0,369
13	0,062	0,055	0,007	0,5	0,455	0,045	0,125	0,153	-0,028	16	15,493	0,507
14	0,062	0,055	0,007	0,5	0,455	0,045	0,125	0,153	-0,028	16	15,493	0,507
15	0,062	0,055	0,007	0,5	0,455	0,045	0,125	0,153	-0,028	16	15,493	0,507
16	0,062	0,089	-0,027	0,25	0,296	-0,046	0,125	0,088	0,037	8	7,812	0,188
17	0,125	0,124	0,001	0,25	0,296	-0,046	0,25	0,195	0,055	16	19,413	-3,413
18	0,062	0,080	-0,018	0,5	0,677	-0,177	0,25	0,176	0,074	16	15,813	0,187

2.4. Estimations des coefficients

2.4.1. *Bacillus subtilis*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (46). D'après ce tableau, le coefficient b_{12} et b_{123} ont été non-significatifs, cela veut dire, que l'interaction entre l'HE d'O.

majorana et celle du *T. serpyllum* n'influence pas significativement le résultat obtenu par ce mélange contre *B. subtilis*.

Tableau 46: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour *B. subtilis*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	p-value
O. majorana	b ₁	0,1394736	0,040872	3,41	0,0058*
T. serpyllum	b ₂	0,1394736	0,040872	3,41	0,0058*
M. spicata	b ₃	0,2394736	0,040872	5,86	0,0001*
O. majorana*T. serpyllum	b ₁₂	0,0578947	0,203218	0,28	0,7810
O. majorana*M. spicata	b ₁₃	1,2578944	0,203218	6,19	<,0001*
T. serpyllum*M. spicata	b ₂₃	1,2578944	0,203218	6,19	<,0001*
O. majorana*T. serpyllum*M. spicata	b ₁₂₃	2,1078993	1,256738	1,68	0,1216

2.4.2. *Staphylococcus aureus*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (47). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b₁, b₂, et b₃ ;
- les termes binaires b₁₂, b₁₃ et b₂₃ ;
- le terme ternaire b₁₂₃.

À partir de ces résultats, nous pouvons certifier que l'activité des HEs vis-à-vis de la souche *S. aureus*, dépend de tous les termes du modèle adapté.

Tableau 47: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour *S. aureus*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	p-value
O. majorana	b ₁	0,2498355	0,044113	5,66	0,0001*
T. serpyllum	b ₂	0,2498355	0,044113	5,66	0,0001*
M. spicata	b ₃	0,9779606	0,044113	22,17	<,0001*
O. majorana*T. serpyllum	b ₁₂	-0,750658	0,219334	-3,42	0,0057*
O. majorana*M. spicata	b ₁₃	-0,544408	0,219334	-2,48	0,0305*
T. serpyllum*M. spicata	b ₂₃	-0,544408	0,219334	-2,48	0,0305*
O. majorana*T. serpyllum*M. spicata	b ₁₂₃	4,5118374	1,356399	3,33	0,0068*

2.4.3. *Escherichia coli*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (48). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b₁, et b₃ ;

- les termes binaires b_{13} et b_{23} ;
- le terme ternaire b_{123} .

D'après ces résultats, la présence de l'HE du serpolet, et son interaction avec celle de la marjolaine n'influence pas l'activité obtenue par ce mélange contre la souche *E. coli*.

Tableau 48: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour *E. coli*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	<i>p-value</i>
O. majorana	b_1	0,2680921	0,087981	3,05	0,0111*
T. serpyllum	b_2	0,1493421	0,087981	1,70	0,1177
M. spicata	b_3	3,9430923	0,087981	44,82	<,0001*
O. majorana*T. serpyllum	b_{12}	0,3348687	0,437446	0,77	0,4601
O. majorana*M. spicata	b_{13}	-7,577632	0,437446	-17,32	<,0001*
T. serpyllum*M. spicata	b_{23}	-7,315132	0,437446	-16,72	<,0001*
O. majorana*T. serpyllum*M. spicata	b_{123}	17,147369	2,705243	6,34	<,0001*

2.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (49). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;
- les termes binaires b_{12} et b_{13} ;
- le terme ternaire b_{123} .

Ces résultats affirment que l'activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* dépend de tous les termes du modèle mathématique adapté, sauf celui traduisant l'interaction entre le serpolet et la menthe.

Tableau 49: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs pour *P. aeruginosa*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	T-student	<i>p-value</i>
O. majorana	b_1	3,8526304	0,22719	16,96	<,0001*
T. serpyllum	b_2	16,05263	0,22719	70,66	<,0001*
M. spicata	b_3	16,05263	0,22719	70,66	<,0001*
O. majorana*T. serpyllum	b_{12}	-8,18948	1,129599	-7,25	<,0001*
O. majorana*M. spicata	b_{13}	-8,18948	1,129599	-7,25	<,0001*
T. serpyllum*M. spicata	b_{23}	0,2105211	1,129599	0,19	0,8555
O. majorana*T. serpyllum*M. spicata	b_{123}	154,61052	6,985642	22,13	<,0001*

2.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D

Les modèles mathématiques retenus pour *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* sont respectivement représentés par les équations (Eq4), (Eq5), (Eq6) et (Eq7).

$$y = 0,139470m + 0,1394736Ts + 0,2394736Mp + 1,25789440mMp + 1,2578944TsMp + 2,107899300mTsMp \text{ Eq: 4}$$

$$y = 0,24983550m + 0,2498355Ts + 0,9779606Mp - 0,7506580mTs - 0,5444080mMp - 0,544408TsMp + 4,51183740mTsMp \text{ Eq: 5}$$

$$y = 0,26809210m + 3,9430923Mp - 7,5776320mMp - 7,315132TsMp + 17,1473690mTsMp \text{ Eq: 6}$$

$$y = 3,85263040m + 16,05263Ts + 16,05263Mp - 8,189480mTs - 8,189480mMp + 154,610520mTsMp \text{ Eq: 7}$$

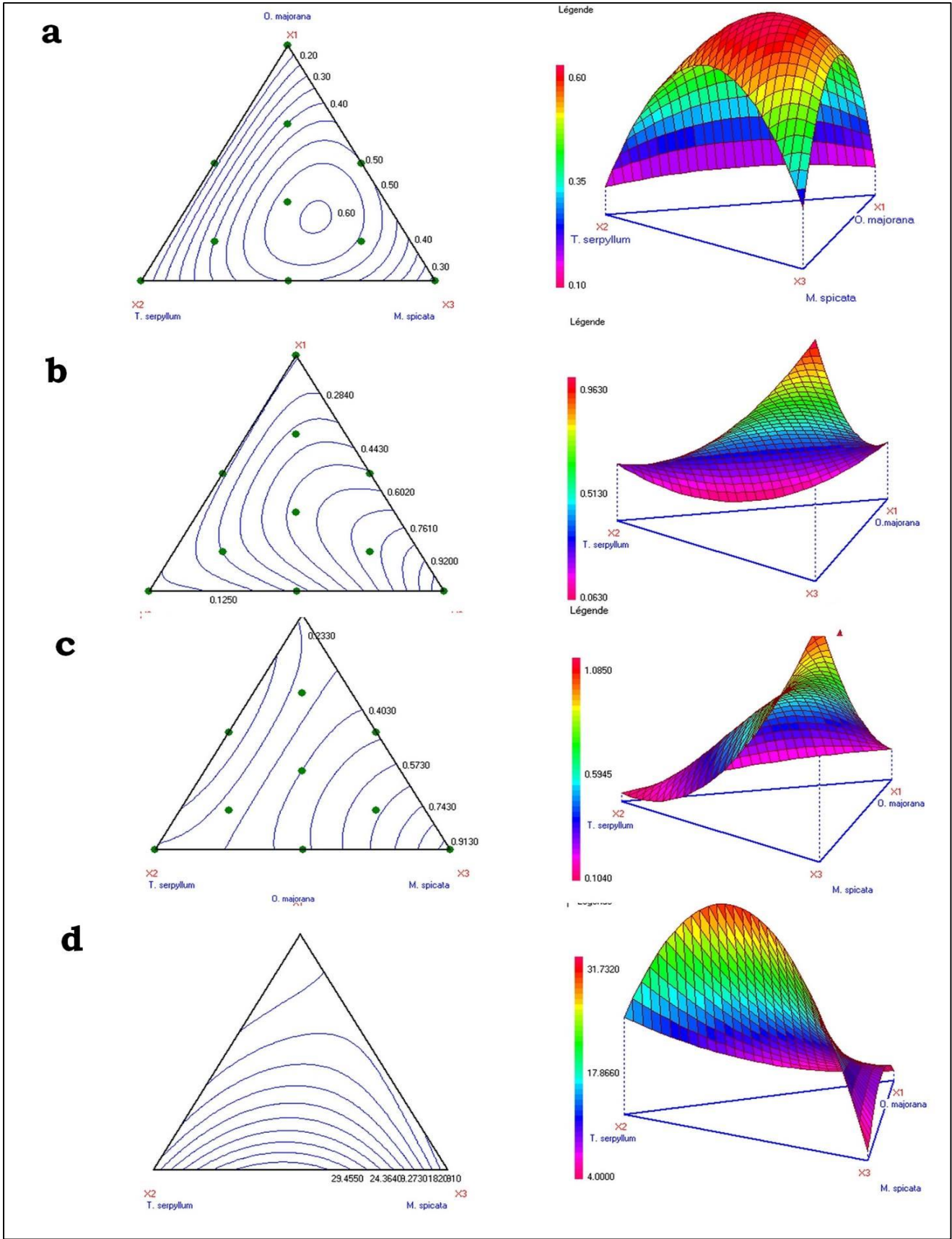


Figure 37 : Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange

2.6. Point-Test

Pour finaliser les tests de la validité du modèle retenu pour le mélange 2, nous nous sommes servis de l'outil point test. Ainsi, nous avons réalisé des essais dont le résultat correspond aux réponses souhaitées (figures 29, 30, 31,32.). Les coordonnées du point test pour les deux Gram positif sont : $X_{O. majorana} = 0,37\%$, $X_{T. Serpyllum} = 0,16\%$, et $X_{M. spicata} = 0,47\%$. Cette formulation a révélé une CMI de 0,5% pour les deux souches et qui correspond exactement aux valeurs prédites par le modèle mathématique.

Concernant les points-test des Gram-négative, la formulation testée a été composée de 18% de l'HE de la marjolaine, 19% de celle du serpolet et 62% de celle de la menthe, une CMI de 1% et de 16% ont été obtenu expérimentalement, respectivement pour *E. coli* et *P. aeruginosa*, des valeurs qui ne sont pas loin de celles calculées (1,18% et 15,96%).

2.7. Optimisation de la formulation

2.7.1. *Bacillus subtilis*

Concernant le mélange 2, un compromis d'avoir une CMI inférieure à 0,25% a été fixé. La zone rose qui apparait sur la figure (38) représente la zone prédite à donner une CMI inférieure à 0,25%.

Le remplacement de l'HE d'origan avec celle de la menthe verte dans ce mélange n'a pas influencé positivement les interactions. En fait, La CMI optimale proposé par le model adopté est celle obtenue par l'huile de serpolet seule ou de marjolaine seule. La désirabilité atteint 89% avec une CMI =0,13%.

L'interaction partiellement synergique entre le serpolet et la marjolaine obtenue dans le chapitre des mélanges binaires contre *B. subtilis*, n'a pas été confirmé avec la méthode des mélanges ternaires qui a montré son effet antibactérien additif. En revanche, si on fait appel aux interprétations de l'indice de CIF adopté par d'autre auteur, on pourra dire qu'on peut obtenir le même effet antibactérien additif, ce qui met en question les normes de la méthode de Damier.

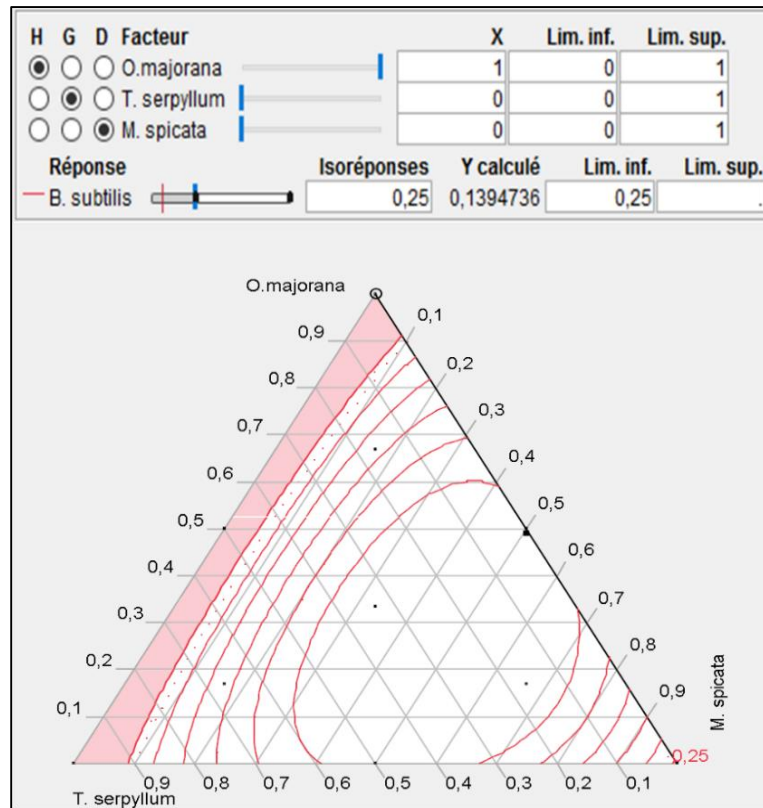


Figure 38: Profiler du mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 pour la souche *B. subtilis*

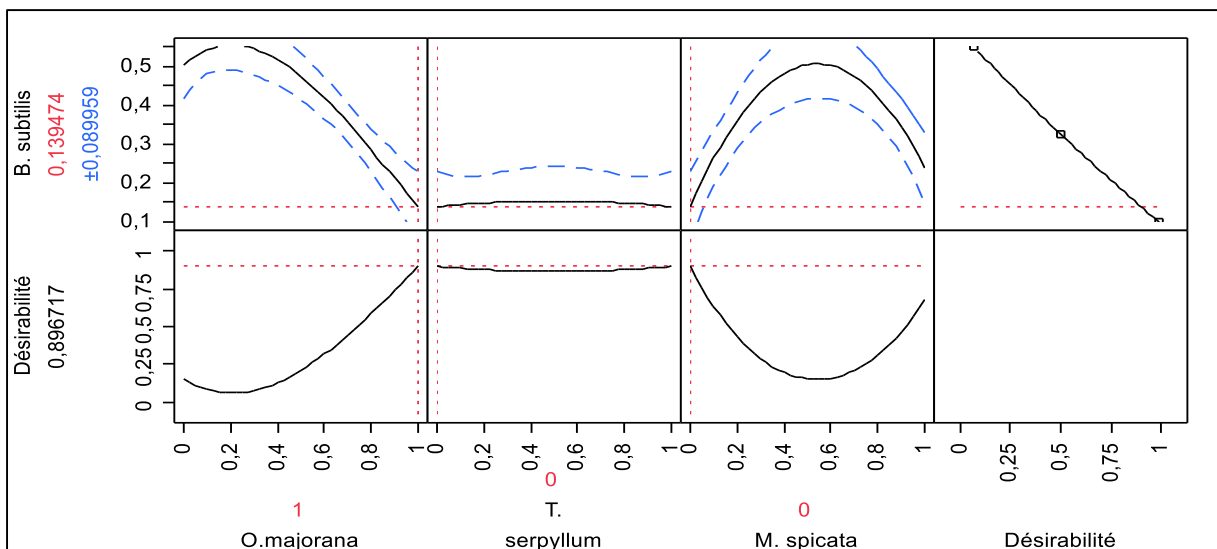


Figure 39: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis *B. subtilis*

2.7.2. *Staphylococcus aureus*

La figure (40) représente la zone rose indiquant les mélanges prédits à donner une CMI inférieure à 0,25%. Pour *S. aureus* aussi, l'échange d'origan par la menthe n'a pas mieux influencé l'effet antibactérien, et la meilleure CMI qui est égale à 0,06%, a été obtenue par un

mélange de moitié moitié du serpolet et de marjolaine. Ainsi, la désirabilité atteint les 94% et le résultat obtenu par le mélange binaire est confirmé par le mélange ternaire.

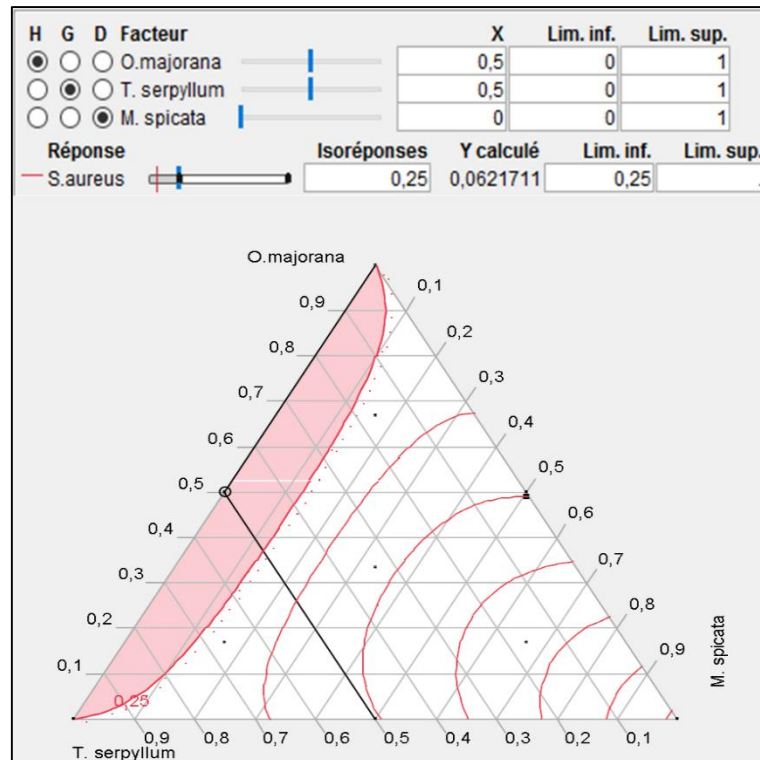


Figure 40: Profileur de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de *S. aureus*

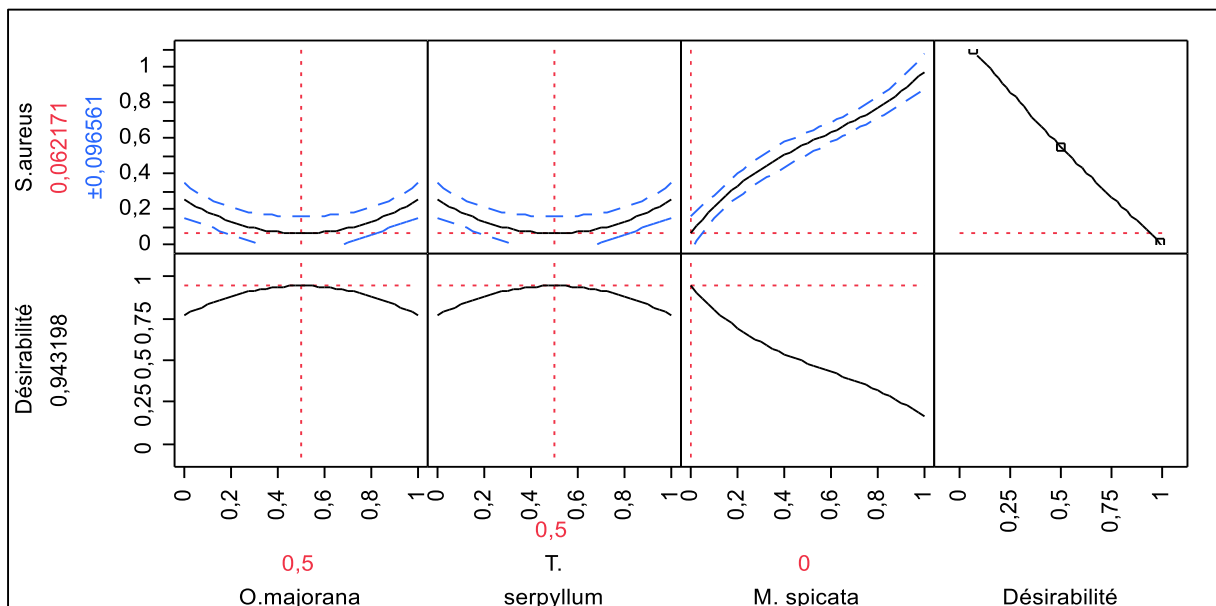


Figure 41: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis *S. aureus*

2.7.3. *Escherichia coli*

Les zones roses sur la figure (42), représente les mélanges capables de produire des interactions permettant d'obtenir une CMI inférieure à 0,25%.

Le remplacement de l'huile d'origan par celle de la menthe a abouti à une interaction très remarquable contre *E. coli*. En fait, l'étude de la désirabilité (figure 43) a mis en relief une CMI de 0,001% qui est prédite d'être obtenue avec un mélange de 0,942% de serpolet, 0,007% de marjolaine et 0,05% de menthe. Ce mélange démontre l'effet des composés minoritaires de l'huile. Effectivement, plusieurs études ont démontré que l'effet antibactérien des HÉs a été déterminé par l'interaction complexe entre les constituants majoritaires et ceux minoritaires. Signalant que dans ce cas, la désirabilité atteint les 99%

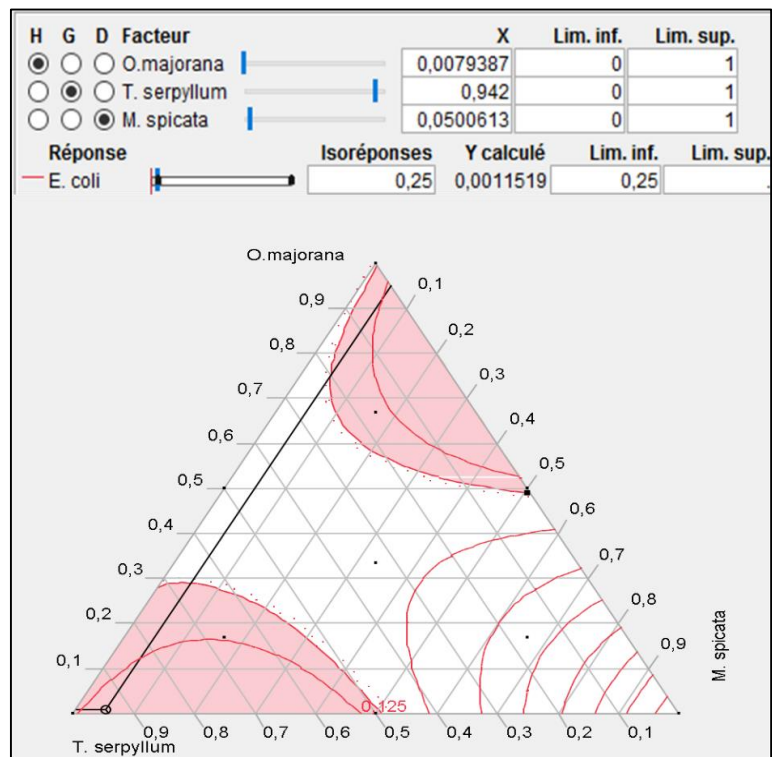


Figure 42: Profil de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de *E. coli*

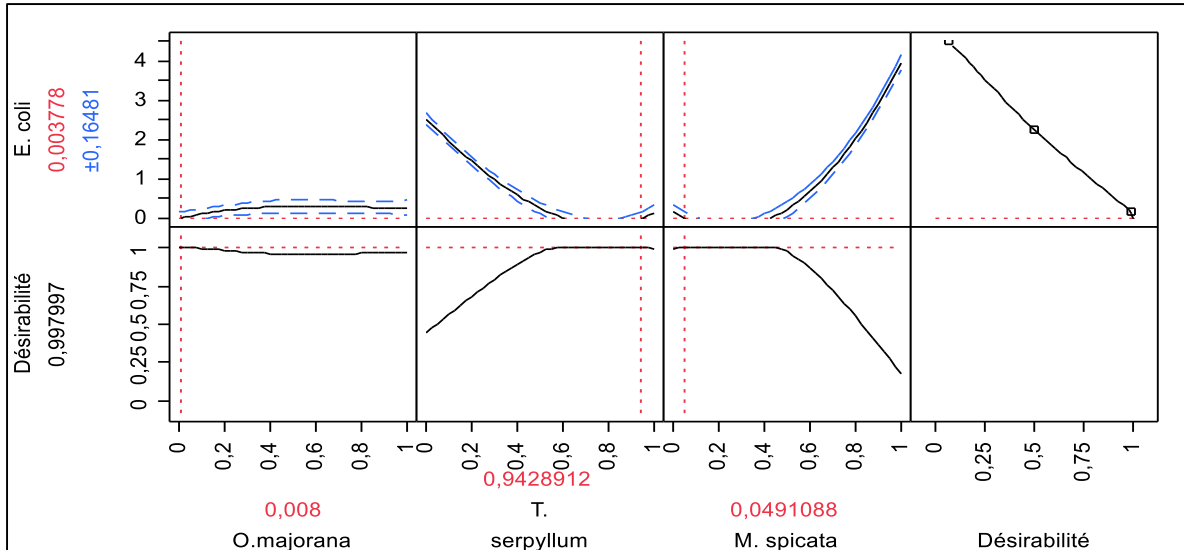


Figure 43: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis *E. coli*

2.7.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Le profileur de mélange de mélange (figure 44), représente la zone rose qui illustre les mélanges produisant une CMI de *P. aeruginosa* inférieure à 4%. Comme il est clair, aucune interaction n'a pu remplacer l'effet de l'HE d'*O. majorana* contre cette souche ci résistante. L'étude de désirabilité a proposé l'HE de la marjolaine comme étant l'huile la plus efficace. Le modèle mathématique prédit une CMI de 3,85%.

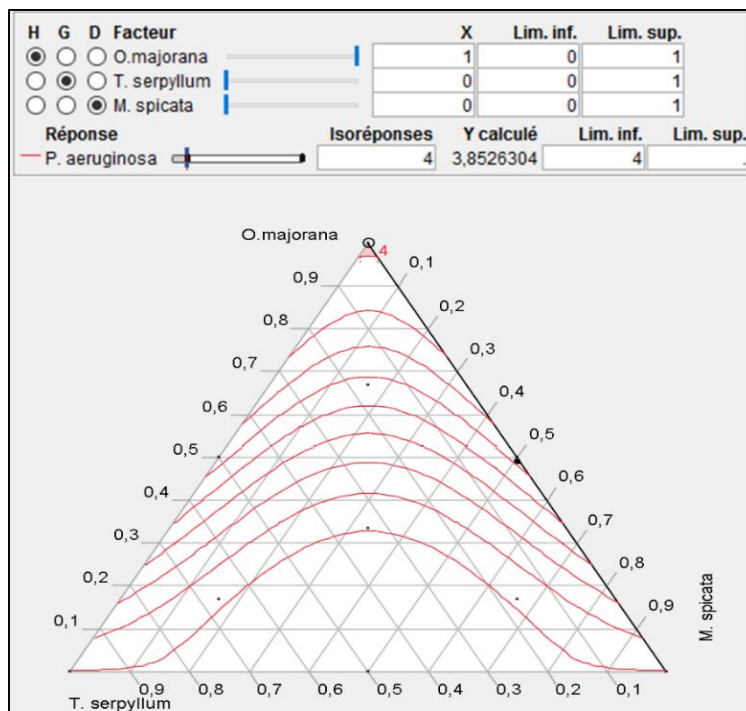


Figure 44: Profileur de mélange 2 pour la réponse CMI=0,25 de *P. aeruginosa*

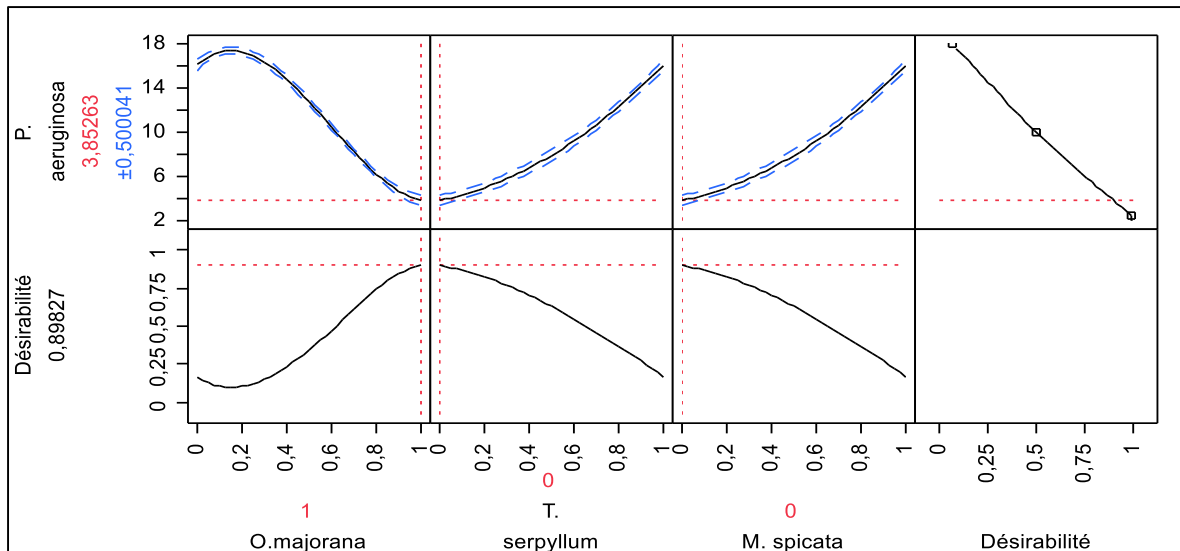


Figure 45: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 2 vis-à-vis *P. aeruginosa*

2.8. Optimisation multiple

L'optimisation de la formulation contre les 4 souches étudiées à la fois, a permis d'obtenir un mélange formé de 0,79% de la marjolaine et 0,20% du serpolet, ce mélange permettra d'obtenir une CMI égale à 0,148%, 0,127%, 0,298% et 5,015% pour respectivement *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

3. Mélange 3 : *Myrtus communis*/*Artemisia herba-alba* / *Thymus serpyllum*

3.1. Réponses

La matrice adoptée pour la formulation et les réponses de toutes les expérimentations appliquant les HES du *M. communis*, *A. herba-alba* et *T. serpyllum* seules ou leurs différentes combinaison sont représentées sur le tableau (50). Les essais ont été réalisés après randomisation.

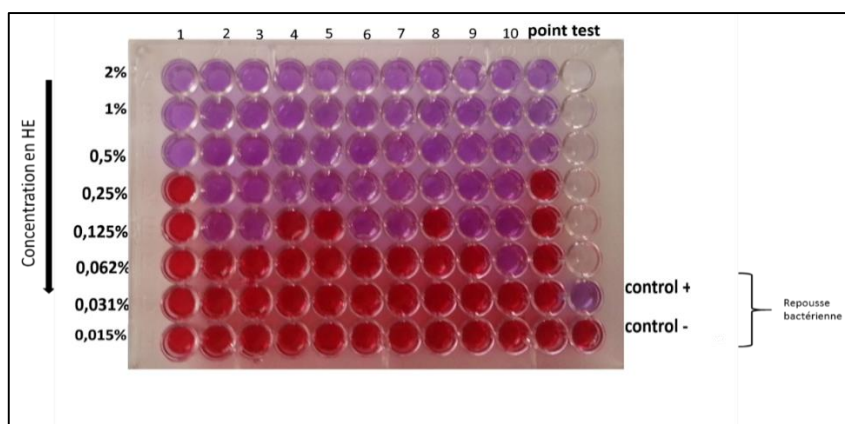


Figure 46: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche *B. subtilis*.

Tableau 50: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange3

N° d'expérience	Huiles essentielles			CIM (%) v/v		
	<i>M. communis</i>	<i>A. herba- alba</i>	<i>T. serpyllum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	33,33	33,33	33,33	0,125	0,5	0,25
2	0	100	0	0,125	1	0,25
3	0	50	50	0,125	0,5	4
4	50	0	50	0,25	0,5	0,125
5	16,67	66,67	16,67	0,125	0,5	0,5
6	0	0	100	0,125	0,25	0,25
7	66,67	16,67	16,67	0,25	1	0,25
8	50	50	0	0,25	1	0,25
9	100	0	0	0,5	1	0,25
10	16,67	16,67	66,67	0,0625	0,5	0,25
11	0	100	0	0,125	1	0,25
12	0	50	50	0,125	0,5	4
13	50	0	50	0,25	0,5	0,5
14	0	0	100	0,125	0,25	0,125
15	50	50	0	0,25	1	0,25
16	100	0	0	0,5	1	1
17	33,33	33,33	33,33	0,125	0,5	0,5
18	33,33	33,33	33,33	0,125	1	0,25

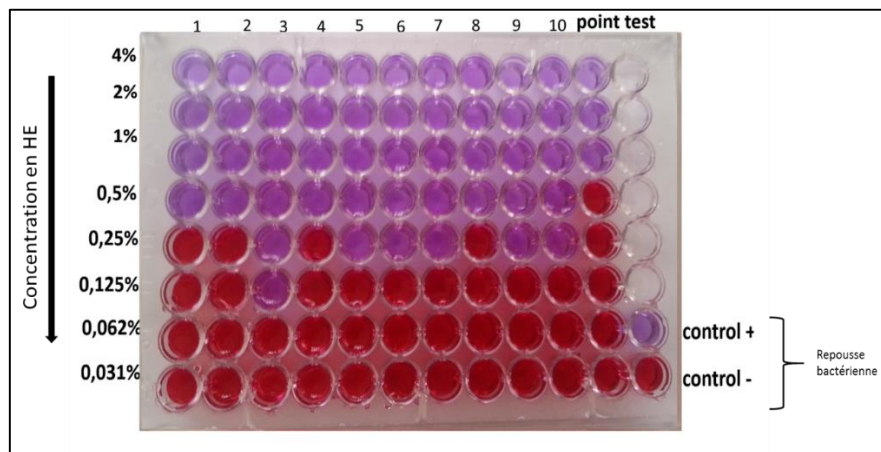


Figure 47: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche *S. aureus*

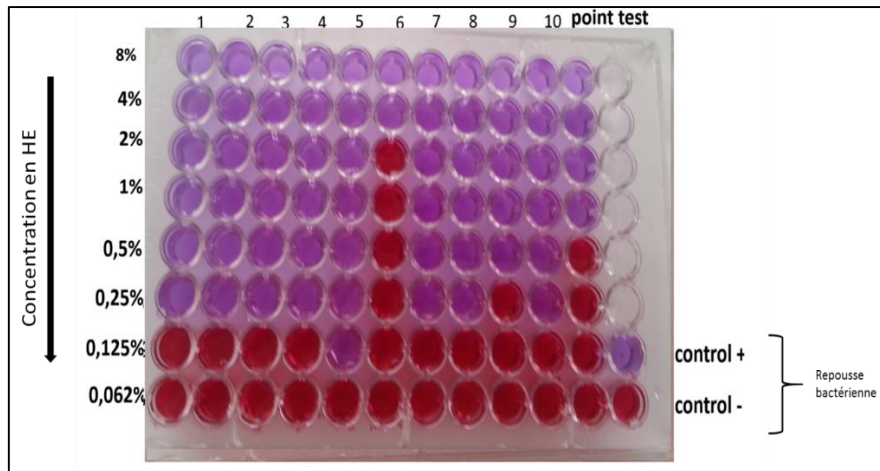


Figure 48: Image qui montre les résultats du test de détermination de la CMI des dix formulations et le point test réalisé avec le mélange 3 sur la souche *E. coli*.

3.2. Validation statistique du modèle postulé

3.2.1. *Bacillus subtilis*

D'après le tableau (51), nous pouvons conclure que l'effet principale de la régression linéaire est significatif, puisque la probabilité de la signification du risque p-value est inférieur à 0,05. Le coefficient de détermination $R^2=98$, ce qui témoigne la corrélation entre les valeurs expérimentales et prévues par le modèle mathématique dont la figure (49), illustre l'allure.

Tableau 51: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre *B. subtilis*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p-value
Modèle	6	0,26400083	0,044	135,2981	<,0001*
Résidus	11	0,0035773	0,000325		
Total	17	0,26757813			
R carré	0,98				
R carré ajusté	0,97				

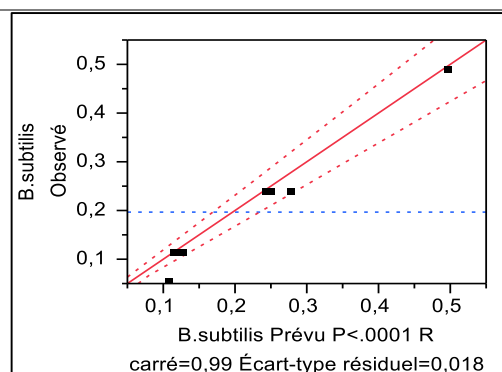


Figure 49: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange3 correspondant à la souche *B. subtilis*

3.2.2. *Staphylococcus aureus*

D'après le tableau (52), nous pouvons conclure que l'effet principale de la régression linéaire est significatif, puisque la probabilité de la signification du risque p-value est inférieur à 0,05. Le coefficient de détermination $R^2=0,89$ témoigne la corrélation entre les valeurs expérimentales et prévues par le modèle mathématique, la figure (50), illustre l'allure.

Tableau 52: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre *S. aureus*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob. > F
Modèle	6	1,2348685	0,205811	16,1557	<,0001*
Résidus	11	0,1401315	0,012739		
Total	17	1,375			
R carré	0,89				
R carré ajusté	0,84				

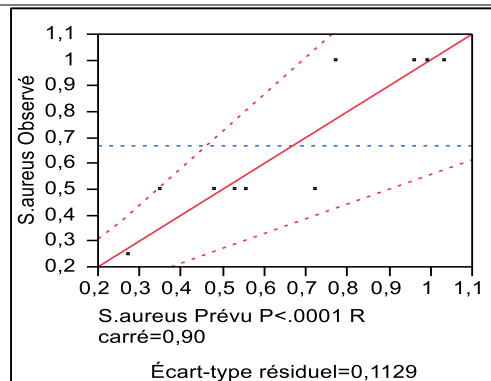


Figure 50: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange3 correspondant à la souche *S. aureus*

3.2.3. *Escherichia coli*

D'après le tableau (52), nous pouvons conclure que l'effet principale de la régression linéaire est significatif, puisque la probabilité de la signification du risque p-value est inférieur à 0,05. Le coefficient de détermination $R^2=90$, ce qui garantit la corrélation satisfaisante entre les valeurs expérimentales et prévues par le modèle mathématique dont la figure (51), illustre l'allure.

Tableau 53: Analyse de la variance pour le modèle postulé pour le mélange 3 contre *E. coli*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p-value
Modèle	6	22,541546	3,75692	17,8163	<,0001*
Résidus	11	2,319565	0,21087		
Total	17	24,861111			
R ²	0,90				
R ² ajusté	0,85				

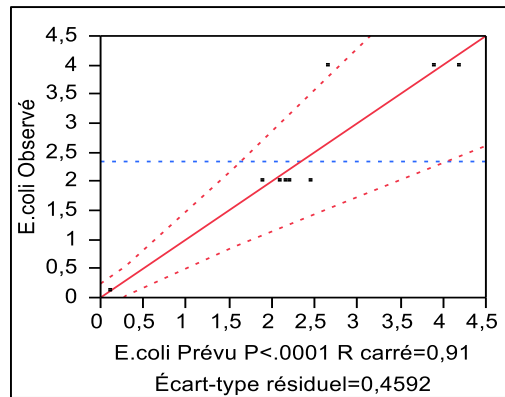


Figure 51: Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le plan de mélange3 correspondant à la souche *E. coli*

3.3. Etude statistique des résidus

Le tableau (54), représente les résidus calculés pour les 4 souches, des différences négligeables ont été observées.

Tableau 54: Résidus entre les valeurs observées et les valeurs calculées pour le mélange 3

N° d'expérience	<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	Yexp	Ycalc	différence	Yexp	Ycalc	différence	Yexp	Ycalc	différence
1	0,125	0,149	-0,024	0,25	0,249	0,001	4	3,89	0,11
2	0,125	0,149	-0,024	0,25	0,249	0,001	4	3,89	0,11
3	0,125	0,149	-0,024	0,25	0,249	0,001	2	2,19	-0,19
4	0,125	0,149	-0,024	0,25	0,249	0,001	2	2,19	-0,19
5	0,25	0,228	0,022	1	0,977	0,023	0,125	0,11	0,015
6	0,25	0,228	0,022	1	0,977	0,023	0,125	0,11	0,015
7	0,125	0,172	-0,047	0,063	0,0626	0,0004	2	2,09	-0,09
8	0,125	0,172	-0,047	0,063	0,0626	0,0004	2	2,09	-0,09
9	0,5	0,502	-0,002	0,5	0,477	0,023	2	1,88	0,12
10	0,5	0,502	-0,002	0,5	0,477	0,023	2	1,88	0,12
11	0,5	0,502	-0,002	0,5	0,477	0,023	4	4,18	-0,18
12	0,5	0,502	-0,002	0,5	0,477	0,023	4	4,18	-0,18
13	0,5	0,577	-0,077	0,5	0,455	0,045	2	2,16	-0,16
14	0,5	0,577	-0,077	0,5	0,455	0,045	2	2,16	-0,16
15	0,5	0,577	-0,077	0,5	0,455	0,045	2	2,16	-0,16
16	0,5	0,403	0,097	0,25	0,295	-0,045	2	2,45	-0,45
17	0,5	0,403	0,097	0,25	0,295	-0,045	4	2,65	1,35
18	0,5	0,54	-0,04	0,5	0,676	-0,176	2	1,89	0,11

3.4. Estimations des coefficients

3.4.1. *Bacillus subtilis*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (54). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;
- les termes binaires b_{12} et b_{13} ;
- le terme ternaire b_{123} .

Ces résultats affirment que l'activité antibactérienne contre *B. subtilis* dépend de tous les termes du modèle mathématique adapté, sauf celui traduisant l'interaction entre le serpolet et l'armoise.

Tableau 55: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche *B. subtilis*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	Rapport t	p-value
M. communs	b_1	0,497204	0,012515	39,73	<,0001*
A.herba-alba	b_2	0,128454	0,012515	10,26	<,0001*
T. serpyllum	b_3	0,119079	0,012515	9,52	<,0001*
M. communs*A.herba-alba	b_{12}	-0,248684	0,062223	-4,00	0,0021*
M. communs*T. serpyllum	b_{13}	-0,267434	0,062223	-4,30	0,0013*
A.herba-alba*T. serpyllum	b_{23}	-0,004934	0,062223	-0,08	0,9382
M. communs*A.herba-alba*T. serpyllum	b_{123}	-2,048685	0,384798	-5,32	0,0002*

3.4.2. *Staphylococcus aureus*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (52). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;

Ces résultats affirment que l'activité antibactérienne contre *S. aureus* dépend juste de l'effet direct des HEs, et aucune interaction n'intervient sur l'effet antibactérien obtenu.

Tableau 56: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche *S. aureus*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	Rapport t	p-value
M. communis	b_1	1,0335526	0,078326	13,20	<,0001*
A. herba-alba	b_2	0,9585526	0,078326	12,24	<,0001*
T. serpyllum	b_3	0,2710526	0,078326	3,46	0,0053*
M. communis*A. herba-alba	b_{12}	-0,01579	0,38944	-0,04	0,9684
M. communis*T. serpyllum	b_{13}	-0,390789	0,38944	-1,00	0,3372
A. herba-alba*T. serpyllum	b_{23}	-0,54079	0,38944	-1,39	0,1924
M. communis*A. herba-alba*T. serpyllum	b_{123}	-3,315788	2,408368	-1,38	0,1960

3.4.3. *Escherichia coli*

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (56). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 et b_2 ;
- les termes binaires b_{12} et b_{23} ;

Ces résultats affirment que l'activité antibactérienne contre *E. coli* dépend de l'effet du myrte et de l'armoise, ainsi que de leur interaction, comme elle dépend de l'interaction entre le serpolet et l'armoise.

Tableau 57: Effet des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs pour la souche *E. coli*

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	Rapport t	<i>p-value</i>
M. communis	b_1	3,8963817	0,31867	12,23	<,0001*
A. herba-alba	b_2	2,196381	0,31867	6,89	<,0001*
T. serpyllum	b_3	0,1151312	0,31867	0,36	0,7247
M. communis*A. herba-alba	b_{12}	-3,814473	1,584442	-2,41	0,0348*
M. communis*T. serpyllum	b_{13}	-0,476975	1,584442	-0,30	0,7690
A. herba-alba*T. serpyllum	b_{23}	12,123027	1,584442	7,65	<,0001*
M. communis*A. herba-alba*T. serpyllum	b_{123}	-20,88947	9,798468	-2,13	0,0564

3.5. Modèles mathématiques retenus et représentation 3D

Les modèles mathématiques retenus pour le mélange 3 contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli* sont respectivement représentés par les équations Eq 8, Eq9 et Eq10.

$$y = 0,497204Mc + 0,128454Aha + 0,119079Ts - 0,248684McAha - 0,267434McTs - 2,048685McAhaTs \quad \text{Eq:8}$$

$$y = 1,0335526Mc + 0,9585526Aha + 0,2710526Ts \quad \text{Eq :9}$$

$$y = 3,8963817Mc + 2,19638Aha - 3,814473McAha - 0,476975McTs + 12,123027AhaTs \quad \text{Eq/ 10}$$

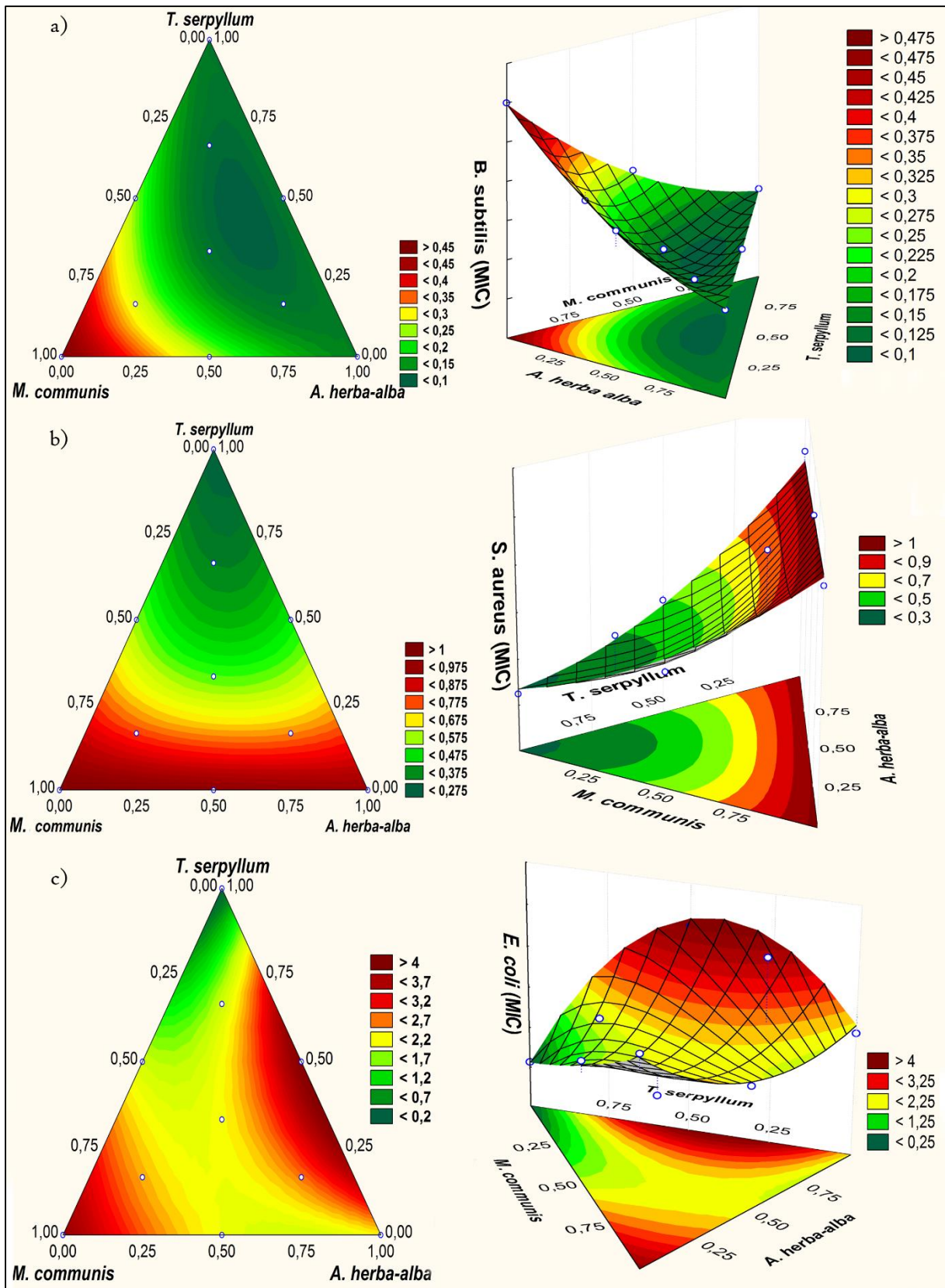


Figure 52: Représentation en 2D et 3D des variations de la CMI par le mélange 3

3.6. Point-Test

Pour finaliser les tests de la validité du modèle retenu, nous nous sommes servis de l'outil point test. Ainsi, nous avons réalisé un essai dont le résultat correspond à la réponse souhaitée. Les coordonnées du point test choisi pour les souches de Gram positive sont : $X_{M. communis} = 0,9\%$, $X_{A.herba-alba} = 0,05\%$ et $X_{T. serpyllum} = 0,05\%$. La CMI obtenue avec cette formulation a été 0,5 et 1 respectivement pour *B. subtilis* et *S. aureus*. Des valeurs très proches de celles calculées par le modèle mathématique de chaque souche 0,43% et 0,96% respectivement.

Concernant Les coordonnées du point test choisi pour *E. coli* sont : $X_{M. communis} = 0,1\%$, $X_{A.herba-alba} = 0,1\%$ et $X_{T. serpyllum} = 0,8\%$. La CMI obtenu expérimentalement et qui est égale à 1% ne s'éloigne pas beaucoup de celle calculé mathématiquement (0,98%).

3.7. Optimisation de la formulation

3.7.1. *Bacillus subtilis*

Rappelons que l'objectif de cette étude est de minimiser la concentration nécessaire à inhiber les souches étudiées. Pour réaliser cela, l'étude de désirabilité a été exécutée, le profileur de mélange représenté par la figure (53) illustre la zone rose qui rassemble les formulations prédites à donner une CMI inférieure à 0,1%.

La figure (54), montre que la désirabilité peut atteindre les 91% avec une CMI de 0,089%, avec 0,171% du myrte, 0,394% d'armoise et 0,434% de serpolet. La formulation avec ces trois HES a réussi a donné une activité antibactérienne considérable dont les composés majoritaire censés être probablement responsables de cette activité sont le piperitone 33,76%, le p-cymene 15,69%, le γ -terpinene 7,95%, le thymol 7,50%, l'acétate de myrtényle 6,01%, le 1,8-cinéol 3,38%, et le limonène 1,53%.

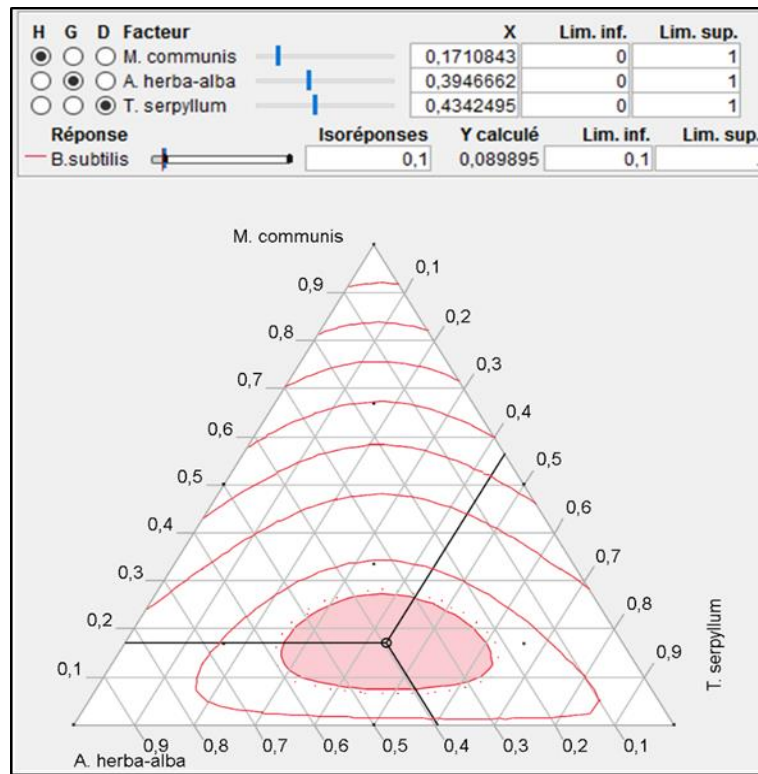


Figure 53: Profilur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche *B. subtilis*

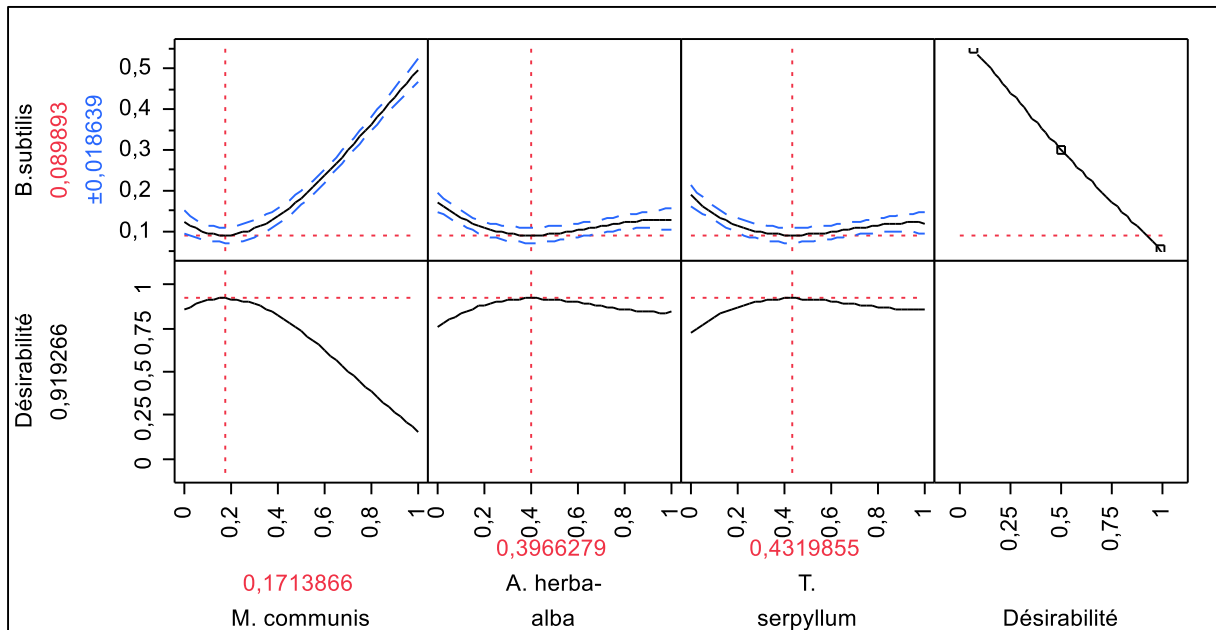


Figure 54: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis *B. subtilis*

3.7.2. *Staphylococcus aureus*

Dans le mélange 3, le compromis fixé a varié entre les souches étudiées, on s'est contenté dans le cas d'*S. aureus* à toute formulation capable de donner une CMI inférieure à 0,3%.

La figure (55) représente le profileur du mélange qui illustre la zone prédictive des formules capable à donner une CMI de *S. aureus* inférieure à 0,3%.

L'absence de synergie entre ces trois huiles a été déjà prévue. En fait, la désirabilité atteint 92% avec une CMI de 0,27% avec l'HE du *T. serpyllum* seule (figure 56).

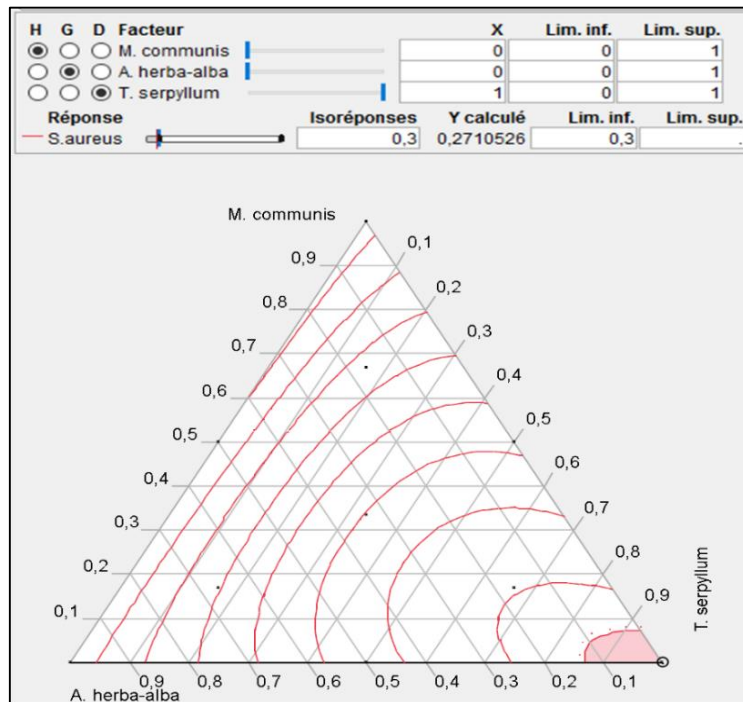


Figure 55: Profileur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche *S. aureus*

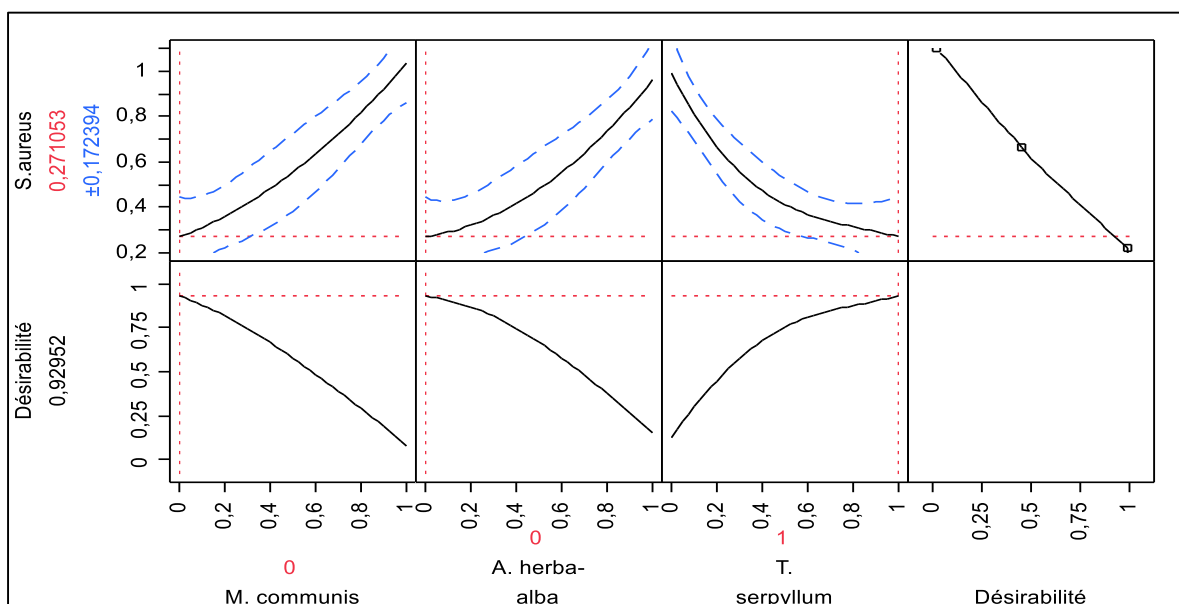


Figure 56: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis *S. aureus*

3.7.3. *Escherichia coli*

Dans le cas d'*E. coli*, un compromis de 0,5% a été fixé. La figure (57) représente le profileur de mélange, où la zone rose illustre les mélanges susceptibles à donner une CMI d'*E. coli* inférieur à 0,5%.

L'absence d'huile porteuse d'alcool a mal influencé le mélange. Ainsi que l'étude de désirabilité a exigé l'huile de serpolet seule pour obtenir une CMI optimale de 0,115%.

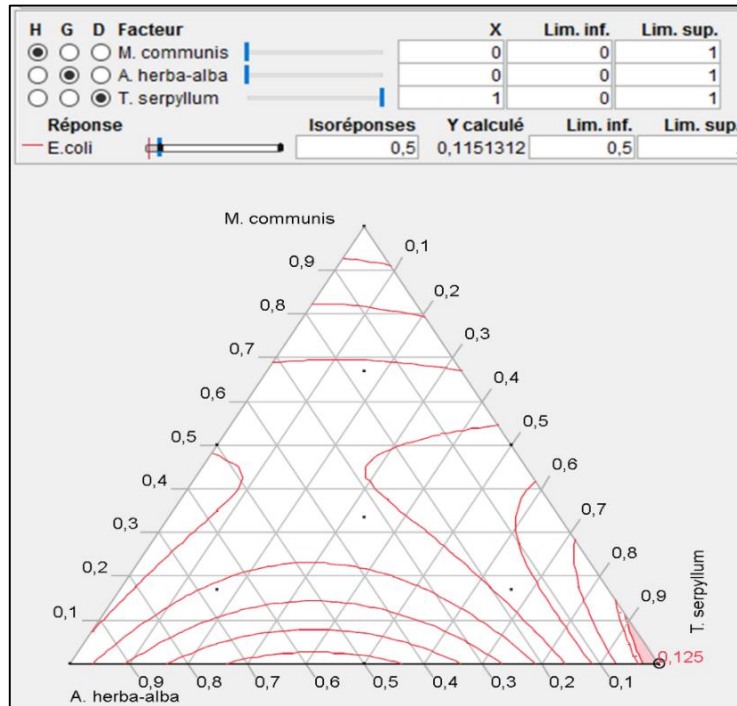


Figure 57: Profileur de mélange 3 pour la réponse CMI=0,1% de la souche *E. coli*

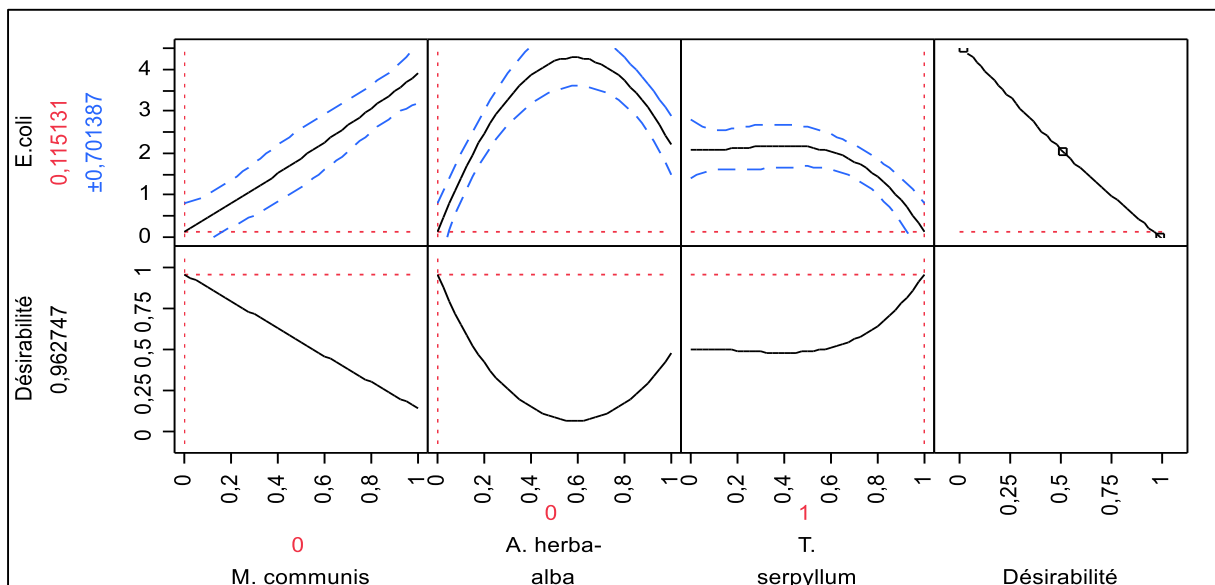


Figure 58: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antibactérienne du mélange 3 vis-à-vis *E. coli*

3.8. Optimisation de formulation multiple

L'optimisation d'une formulation idoine à donner les CMI les plus faibles contre les quatre souches, cela a mené à définir le mélange formé de 0,0024 de myrte, 0,0024 d'armoise et ,995 de serpolet, une CMI de 0,11%, 0,27% et 0,15% contre, respectivement, *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*.

4. Discussion des mélanges ternaires : activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de trois mélanges d'HE a été testée dans cette étude. Le premier mélange a été préparé avec l'HE d'*O. compactum*, celle d'*O. majorana*, et celle de *T. serpyllum*. Ces trois huiles qui ont été actives sur *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*, ont permis la combinaison de trois familles terpéniques majoritaires : phénols (carvacrol, thymol), alcools (trans-thujanol, terpinèn-4-ol), et hydrocarbures (p-cymène, γ -terpinène), et d'évaluer par conséquence l'effet antibactérien produit par leurs interactions.

Les amplitudes des interactions entre deux HEs semblent dépendre de la souche cible. En effet, un effet antagoniste significatif, entre l'HE d'origan et celle de marjolaine, a été trouvé contre *B. subtilis* et *S. aureus* (Gram +), tandis que le même mélange a présenté un effet synergique significatif contre *E. coli*. En fait, il a été rapporté que la combinaison de monoterpènes phénoliques avec des alcools a produit un effet synergique sur plusieurs microorganismes. En effet, la combinaison du thymol ou du carvacrol ou des deux avec l'eugénol a produit un effet synergique contre la souche *E. coli*. Ce fait pourrait expliquer l'effet synergique obtenu avec la combinaison de l'huile d'origan (prédominant par le thymol et le carvacrol) et celle de la marjolaine (prédominant par le terpinen-4-ol et le trans-4-thujanol) contre *E. coli*[70].

L'HE de la marjolaine et du serpolet ont montré un effet synergique antibactérien contre *S. aureus* ($p < 0,001$), alors qu'aucune interaction positive significative n'a été observée contre *B. subtilis* ($P > 0,05$). Cependant, l'interaction entre ces deux huiles contre *E. coli* a montré un coefficient positif significatif indiquant un effet antagoniste ($P < 0,05$). En ce qui concerne la combinaison des HEs d'*O. majorana* et de *T. serpyllum*, on peut toujours considérer le mélange des composés majoritaire comme le premier fait responsable du type d'interaction obtenu, le mélange de p-cymène et de γ -terpinène (monoterpènes hydrocarboné) et de (-) terpinène-4-ol, trans- Thujanol (alcools monoterpéniques) rappelle le mécanisme des hydrocarbures monoterpéniques / Alcools cité ci-dessus, aboutissant à une synergie contre *S. aureus*. Cependant, pour l'effet antagoniste obtenu contre *E. coli*, cela pourrait être expliqué par la

capacité des hydrocarbures à diminuer la solubilité des alcools censé être très actifs sur les Gram-.

Un effet synergique significatif a été observé par l'association d'huiles d'origan et de serpolet sur *S. aureus* ($p < 0,02$), tandis qu'un effet antagoniste significatif a été observé chez *B. subtilis* ($p < 0,001$), un mécanisme souche-dépendant a pu avoir lieu dans cette combinaison.

En ce qui concerne l'interaction entre les trois HEs, les coefficients trouvés ont montré un effet synergique significatif contre les bactéries Gram-positives ($p < 0,001$). Cependant, cette interaction ne présente aucun avantage significatif vis-à-vis *E. coli*.

Le deuxième mélange a été formulé de l'HE de la marjolaine, celle de la menthe verte et celle du serpolet, les huiles de trois plantes très utilisées en cuisine. Ce mélange a permis la mise en interaction de trois familles majoritaires, des alcools ((-) terpinène-4-ol, trans-Thujanol), une cétone (carvone), et des hydrocarbures (p-cymène et γ -terpinène).

Suivant les équations des modèles adoptés pour ce mélange, les mélanges binaires ont mené à un effet antagoniste contre *B. subtilis*, cependant qu'un effet synergique a été observé contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ce mélange a été souche dépendant, une différence significative de la sensibilité des deux souches à Gram positif a été observée. En effet les interactions binaire entre les trois huiles a influencé négativement l'effet antibactérien contre *B. subtilis*, contrairement à *S. aureus*, *E. coli*, et *P. aeruginosa*. Cependant, le mélange ternaire a influençait négativement les quatre souches étudiées.

Le troisième mélange a été formé de l'HE du myrte, de celle l'armoise blanche et celle du serpolet. Ces trois huiles ont été actives contre les quatre souches étudiées. C'est un mélange qui a permis d'assembler majoritairement un éther, une cétone, et des hydrocarbures monoterpéniques.

Suivant les équations des modèles, l'huile de *T. serpyllum* a les coefficients les plus faibles, suivie de celle de *A. herba-alba* et ensuite de *M. communis*, ce fait confirme leur ordre antibactérien précédemment discuté. Les grandeurs des interactions binaires (entre deux HEs) semblent dépendantes de la souche cible. En effet, un effet synergique significatif a été obtenu à partir des interactions binaires du myrte / serpolet et myrte / armoise contre *B. subtilis* ($p < 0,01$). Alors, seule l'interaction binaire myrte / armoise était significativement synergique contre *E. coli* ($p < 0,05$). Néanmoins, aucune contribution significative des interactions binaires contre *S. aureus* n'a été observée ($p > 0,05$). Inversement, un effet antagoniste significatif, entre

l'HE de l'armoise et celle de serpolet, a été trouvé contre *E. coli* ($p < 0,001$), alors que la même interaction n'a pas donné d'effet significatif contre *B. subtilis* ($p > 0,05$). En outre, l'interaction ternaire n'a été significativement synergique que contre *B. subtilis* ($p < 0,001$).

En fait, les principaux composés de l'huile de myrte sont le 1,8-cineol et le linalool, et ceux de l'huile de serpolet sont le p-cymène, le γ -terpinène et le thymol. Ce fait, pourrait donner une hypothèse explicative à l'effet synergique obtenu par leur combinaison et expliquer leurs interactions possibles avec *B. subtilis*. En fait, il a été rapporté que la combinaison de thymol / linalool et de thymol / 1,8-cineol contre plusieurs souche produit un effet antibactérien synergique [234], [235]. De plus, la combinaison du 1,8-cineol et des monoterpènes hydrocarbonés tels que le limonène et l'aromadendrène a déjà montré un effet additif ou synergique [79], [231] Ainsi, la combinaison de 1,8-cineol et de p-cymène, a déjà montré un effet synergique antifongique [235].

En ce qui concerne les HEs de myrte et d'armoise, les deux compositions chimiques étudiées étaient prédominées par une quantité considérable de monoterpènes oxygénés (acétate de myrtényle, 1,8-cineol, linalol et pipéritone). Par conséquent, leur combinaison pourrait augmenter le rapport des monoterpènes oxygénés. Ce qui pourrait être plus efficace et produire un effet synergique contre *E. coli* et *B. subtilis*. En effet, Nazzaro et al ont rapporté l'activité antimicrobienne de la plupart des terpénoïdes à leurs groupes fonctionnels hydroxyle, carboxyle ... qui affectent différents sites dans les cellules bactériennes [214].

L'effet antagoniste obtenu par l'interaction du serpolet et de l'armoise vis-à-vis d'*E. Coli* pourrait être mieux expliqué à l'aide de la représentation 3D. Où on observe que la CMI augmente avec la quantité croissante d'armoise dans le mélange total, ce qui pourrait réduire le rapport p-cymène et γ -terpinène et thymol interagissent habituellement en synergie et ont le même mécanisme d'action (c.-à-d. Diminution des températures de fusion lipidique des membranes modèles, ce qui suggère une fluidité membranaire accrue) [220]. De plus, selon l'interprétation de la CMB, il a été montré que l'armoise avait un effet bactériostatique contre *E. coli*, tandis que le serpolet avait un effet bactéricide, leur combinaison peut soutenir l'hypothèse selon laquelle l'antagonisme se produit lorsque des antimicrobiens bactériostatiques et bactéricides sont combinés [116].

En ce qui concerne l'interaction entre les trois HEs, les coefficients trouvés ont montré un effet synergique significatif contre *B. subtilis* ($p < 0,001$). Cependant, cette interaction n'a pas montré de contribution significative contre *S. aureus* et *E. coli*. Dans cette combinaison ternaire, la zone

optimale est située dans la base du triangle, ce qui signifie que les quantités de serpolet et d'armoise sont considérables par rapport au myrte. Cependant, le coefficient d'interaction binaire de l'armoise / serpolet n'était pas significatif avant, alors qu'avec la présence d'huile de myrte, un coefficient significatif a été obtenu. En effet, plusieurs données publiées ont montré l'importance de certains composés d'HEs mineures. Delaquis et al. [74] ont démontré que l'HE d'aneth, de coriandre ont été plus efficace que leurs fractions et que le meilleur effet était observé avec l'huile brute. Il a également démontré que certaines fractions étaient meilleures que leurs huiles brutes.

IV- Conclusion

Dans ce chapitre, on a pu évaluer, dans une seule manipulation, l'effet antibactérien de trois interactions binaires, et une ternaire. Tout en modélisant cet effet, en ayant une équation descriptive validée statistiquement. Ce qui prouve que la méthode des plans de mélange demeure une méthode économique pour ce type d'essai.

L'efficacité antibactérienne des HEs étudiées dépendait de l'apport de chaque huile dans le mélange et des bactéries cibles. La présente étude a montré que l'optimum a été souche-dépendant. Cependant, le choix d'un mélange efficace commun est encore possible. En outre, les résultats obtenus confirment qu'aucune relation générale entre les Gram et l'activité antibactérienne ne peut être établie pour les HEs. Ainsi, les recettes de mélanges ne doivent pas être utilisées traditionnellement, mais étudiées et modélisées selon l'agent pathogène cible. Désormais, ces résultats peuvent contribuer à une application réussie des conservateurs naturels dans les industries alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques.

Chapitre V : Activité antioxydante

I. Introduction

Au large de cette étude, il faut se rappeler que l'effet conservateur des HEs contre les bactéries a déjà été démontré, et les conservateurs d'aliments contenant des HEs ont été commercialisés depuis les années 1990 [29]. En outre, ils ont été utilisés dans des emballages alimentaires et des films d'emballage comestibles pour éviter les agents pathogènes dégradant les aliments [236]. Cependant, plusieurs études ont souligné la nécessité de concentrations énormes de ces produits végétaux pour obtenir les mêmes effets que ceux trouvés *in vitro* [71], [72]. Par conséquent, l'étude des effets interactifs entre différentes classes de composés phytochimiques, en particulier les HEs et leurs composés, pourrait être un outil sûr pour potentialiser leurs effets et ainsi surmonter l'empêchement de leurs applications dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [224], [237], [238]. Ces industries, ont aussi fait appel aux antioxydants, un des vertus des HEs déjà mis en valeur par plusieurs études. En effet, les radicaux libres sont la principale cause de la détérioration de beaucoup de produit par l'oxydation de substances facilement oxydables, telles que les graisses et les protéines [239]. Par conséquent, des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont fréquemment utilisés pour prévenir ou retarder cette oxydation. Cependant, BHA et BHT sont connus par leur effet nocif sur la santé humaine [240].

Ce chapitre a pour but d'étendre le domaine d'exploitation des HEs étudiées. Pour cela, la capacité de balayer le radical libre DPPH de chaque HE a été analysée. Ainsi que celle des combinaisons tertiaires déjà étudiées.

II. Matériel et méthodes :

1. Criblage :DPPH

L'activité anti-radicalaire a été évaluée en mesurant l'activité de piégeage du radical libre DPPH, en utilisant la méthode décrite Mighri et al [157]. D'abord, on prépare une solution de 4mg de DPPH dans 100 mL de méthanol (0,004%), puis on la garde dans l'obscurité 4 heures. Ensuite, une série de dilution des onze HEs de différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 mg / ml) est préparées dans du méthanol. Ainsi, le BHT est utilisé comme standard, préparé dans du méthanol en série de dilution allant de 20 à 0,002mg / mL. Puis 3 ml de solution des échantillons sont mélangés avec 3mL de la solution de DPPH. Ces mélanges est ensuite maintenus à l'obscurité pendant 30 min, puis la densité optique est mesurée à 517nm en utilisant

un spectrophotomètre de type Vis-UV JENWAY 6800. 3mL de méthanol avec 3 mL de solution de DPPH (0,004%) ont été utilisés comme blanc, les mesures ont été réalisées en trois répétitions. L'activité antioxydante a été calculée comme suit :

$$AA\% = \frac{Abs_{control} - Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{control}} * 100$$

Avec :

AA : Activité Antioxydante ;

Abs : absorbance.

2. Mélange ternaire : DPPH

La formulation ternaire des HEs s'est basée sur le plan de mélange centré. Ce plan a été réalisé avec le logiciel NemrodW, sans contraintes, avec randomisation. Les différentes expériences à réaliser sont : Les sommets du triangle (1 ; 2 ; 3) correspondent aux huiles pures, les centres des arêtes correspondent aux mélanges moitié-moitié de deux huiles pures (4 ; 5 ; 6) et le centre de gravité du triangle correspond au mélange contenant un tiers de chaque huile pure (7), (Tableau 58).

La formulation a été réalisée de façon à obtenir des solutions contenant 3mg/ml, l'activité antioxydante des mélanges a été procédée comme décrit ci-dessous. La conception expérimentale complète pour chaque bactérie est composée de 15 expériences : Trois répétitions du point central, et deux pour les autres expériences.

Tableau 58: Teneur des mélanges en HEs étudiées

N° d'expérience	Huile1	Huile 2	Huile 3
1	100%	-	-
2	-	100%	-
3	-	-	100%
4	50%	50%	-
5	50%	-	50%
6	-	50%	50%
7	33%	33%	33%

III. Résultats et discussion :

1. Criblage : DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante des produits naturels in vitro peut être réalisée avec différentes méthodes. Par conséquent, l'analyse DPPH a été utilisée dans cette étude. Les résultats ont été comparés avec l'antioxydant synthétique BHT.

Le tableau (59) rassemble les IC50 obtenues pour les HEs étudiées, ainsi que celle du BHT.

T. serpyllum et *M. spicata* ont enregistré les IC50 les plus faibles, ce qui traduit leurs forts effets antioxydants qui dépasse celui de la BHT. Généralement toutes les huiles ont montré une forte capacité de piégeage du radical DPPH, à l'exception de celles du *C. aurantium* (feuilles et zest).

Les HEs sont des mélanges complexes de composés appartenant à des familles chimiques diverses, et plusieurs facteurs sont responsables des variations du niveau de leur activité antioxydante. Par ailleurs, les auteurs ont souvent attribué la forte activité antioxydante à la présence de quantités relativement élevées de composés phénoliques, tels que le thymol et le carvacrol [88]. En effet, leur capacité à piéger le radical DPPH a été déjà publiée par Aazza *et al* [241], ainsi que celle de α -pinène, p-cymène, linalool, acétate de linalyl, 1,8-cineole, limonène, bornéol et δ -3-Carene. D'autres alcools comme le citronellol et le geraniol ont aussi montré leurs capacité antioxydante [242][243]. Kulisic *et al* [244], ont montré différents comportements antioxydants des HEs. En fait, L'HE *d'O. vulgare* contenant 67% de thymol plus carvacrol et ~ 14% de α - et γ - terpinène, offre un exemple de synergie entre les composants des huiles. Alors que sa fraction isolée d'hydrocarbures n'a offert aucun effet antioxydant, et la fraction oxygénée (contenant environ 94% de thymol + carvacrol) n'a pas été différente du carvacrol isolé ou du thymol seule. D'autre part, l'HE de *S. montana*, contenant ~50% de thymol et de carvacrol, et seulement 6% de γ -terpinène, donne le même effet que sa fraction oxygénée (~ 70% de carvacrol + thymol), légèrement moins efficace que le carvacrol pur ou le thymol, tandis que la fraction hydrocarbonée a procuré une effet négligeable. En d'autres termes, le comportement antioxydant a été simplement celui attendu du contenu des composants les plus efficaces. Les huiles des deux espèces de thymus, contenant environ 80% thymol + carvacrol et ~ 5,5% de γ -terpinène chacun, ont eu un comportement quelque peu intermédiaire. Au contraire de *S. cuneifolia*, contenant seulement 13% de phénols, pas de γ -terpinène et une abondance de terpénoïdes insaturés comme le linalool, a été influencé par l'effet pro-oxydant intense de sa fraction d'hydrocarbures neutralisant le comportement antioxydant de la fraction oxygénée, de sorte que l'ensemble de l'huile aboutis à un comportement pro-oxydant clair. On peut dire donc que la performance globale en tant qu'antioxydant est, en fait, le résultat de l'interaction complexe entre les composants, on peut s'attendre à un comportement synergique ou antagoniste

Tableau 59: IC50 obtenues pour les HEs

Plantes	IC50 (mg/ml)
<i>O. compactum</i>	0,49 ± 0,019
<i>O. majorana</i>	1,88 ± 0,20
<i>T. serpyllum</i>	0,07 ± 0,01
<i>P. asperum</i>	14,62 ± 0,19
<i>O. mixta</i>	0,59 ± 0,11
<i>L. dentata</i>	0,382 ± 0,002
<i>M. spicata</i>	0,13±0,00
<i>M. communis</i>	0,408 ± 0,006
<i>A. herba-alba</i>	3,42 ± 0,10
<i>C. aurantium (feuilles)</i>	29,24 ± 7,89
<i>C. aurantium (zest)</i>	60,90 ± 12,78
<i>BHT</i>	0,33 ± 0,00

2. Mélange ternaire

2.1.Mélange1 : *Origanum compactum/Origanum majorana/Thymus serpyllum*

2.1.1. Réponses expérimentales

La matrice utilisée pour la formulation, et l'activité antioxydante obtenue pour chaque expérience est représenté sur le tableau (60).

Tableau 60: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales obtenues par le mélange 1

N° d'expérience	Huiles essentielles (%)v			AA%
	O. compactum	O. majorana	T. serpyllum	
1	50	0	50	79,55
2	100	0	0	75,13
3	33,333333	33,333333	33,333333	74,74
4	50	0	50	73,91
5	50	50	0	71,49
6	0	50	50	55,04
7	0	100	0	47,30
8	0	50	50	56,04
9	0	0	100	69,63
10	0	100	0	52,32
11	0	0	100	66,41
12	100	0	0	74,96
13	33,333333	33,333333	33,333333	73,31
14	50	50	0	74,48
15	33,333333	33,333333	33,333333	73,31

2.1.2. Validation statistique

D'après le tableau (61), nous pouvons conclure que l'effet de la régression linéaire est significative, vu que la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0,05%.

Le coefficient de détermination $R^2=0,97$, une valeur satisfaisante pour décrire l'allure de la courbe représentant les valeurs expérimentales en fonction des valeurs prédites par le modèle mathématique (figure 59).

Tableau 61: Analyse de la variance pour le modèle postulé par le mélange 1

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p -value
Modèle	6	1373,7461	228,958	45,7057	<,0001*
Résidus	8	40,0751	5,009		
Total	14	1413,8212			
R^2	0,97				
R^2 ajusté	0,95				

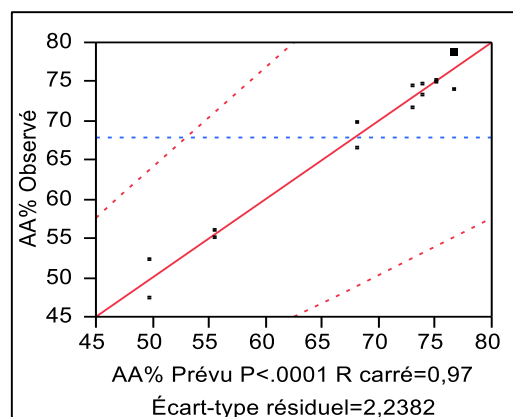


Figure 59: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 1

2.1.3. Etude des résidus

Le tableau (62), représente les résidus calculés pour les 4 souches, des différences négligeables ont été observées

Tableau 62: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par le modèle du mélange 1

Expérience	Y _{exp}	Y _{cal}	Differences
1	75.126	75.042	0.084
2	74.958	75.042	-0.084
3	47.000	51.000	-4.000
4	55.000	51.000	4.000
5	69.632	68.022	1.610
6	66.412	68.022	-1.610
7	71.485	72.985	-1.500
8	74.485	72.985	1.500
9	73.905	76.728	-2.823
10	79.551	76.728	2.823
11	55.043	55.539	-0.496
12	56.035	55.539	0.496
13	73.310	73.933	-0.623
14	74.744	73.933	0.811
15	73.744	73.933	-0.189

2.1.4. Estimation des coefficients

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (63). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;
- les termes binaires b_{12} et b_{13} .

Ces résultats montrent que l'effet antioxydant global obtenu par ce mélange est influencé par l'effet antioxydant de chaque huile seule et par l'interaction de l'HE d'origan avec celle de marjolaine ainsi que avec celle du serpyllum. Cependant aucune interaction ternaire n'influence l'effet antioxydant du mélange.

Tableau 63: Effets des coefficients du modèle du mélange 1 qui relie la réponse aux facteurs

Terme	coefficients	Estimatio n	Écart- type	Rapport t	<i>p-value</i>
O. compactum	b_1	75,041966	1,582622	47,42	<,0001*
O. majorana	b_2	49,81	1,582622	31,47	<,0001*
T. serpyllum	b_3	68,02228	1,582622	42,98	<,0001*
O. compactum*O. majorana	b_{12}	42,253951	7,753234	5,45	0,0006*
O. compactum*T. serpyllum	b_{13}	20,784374	7,753234	2,68	0,0279*
O. majorana*T. serpyllum	b_{23}	-13,50677	7,753234	-1,74	0,1197
O. compactum*O. majorana*T. serpyllum	b_{123}	107,81547	48,65116	2,22	0,0575

2.1.5. Modèle mathématique et représentation 3D

Le modèle mathématique retenu est représenté par l'équation (Eq11)

$$y = 75,040c + 49,810m + 68,02Ts + 42,250cOm + 20,780cTs \quad Eq11$$

La figure (60), représente la représentation 3D obtenu à l'aide du modèle mathématique, l'activité antioxydante à obtenir, et les interactions entre les trois huiles du mélange 1 sont mieux exposées.

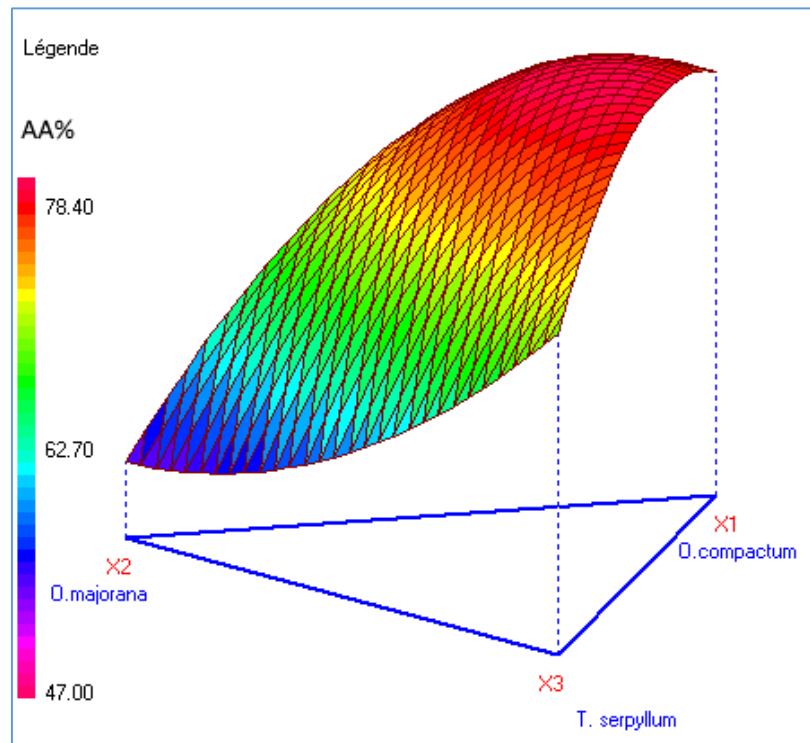


Figure 60 : Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 1

2.1.6. Point-Test

Pour finaliser les tests de la validité du modèle retenu, nous nous sommes servis de l'outil point test. Ainsi, nous avons réalisé un essai dont le résultat correspond à la réponse souhaitée. Les coordonnées du point test sont : $X1=0,16667$; $X2=0,16667$; $X3=0,66667$ ont permis l'obtention d'une inhibition radicalaire de 67,5%, une valeur qui est très proche de celle obtenue par le modèle mathématique équivaut à 70,13%.

2.1.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

Pour l'activité antioxydante, le but toujours est de maximiser la réponse. La zone rose sur la figure (61) illustre les formulations possibles à donner une activité antioxydante qui dépasse les

78%. L'étude de désirabilité montre que l'activité antioxydante optimale à obtenir est de 78,8% avec un mélange de 0,64% d'origan, 0,13% de marjolaine et 0,21% de serpolet, (figure62).

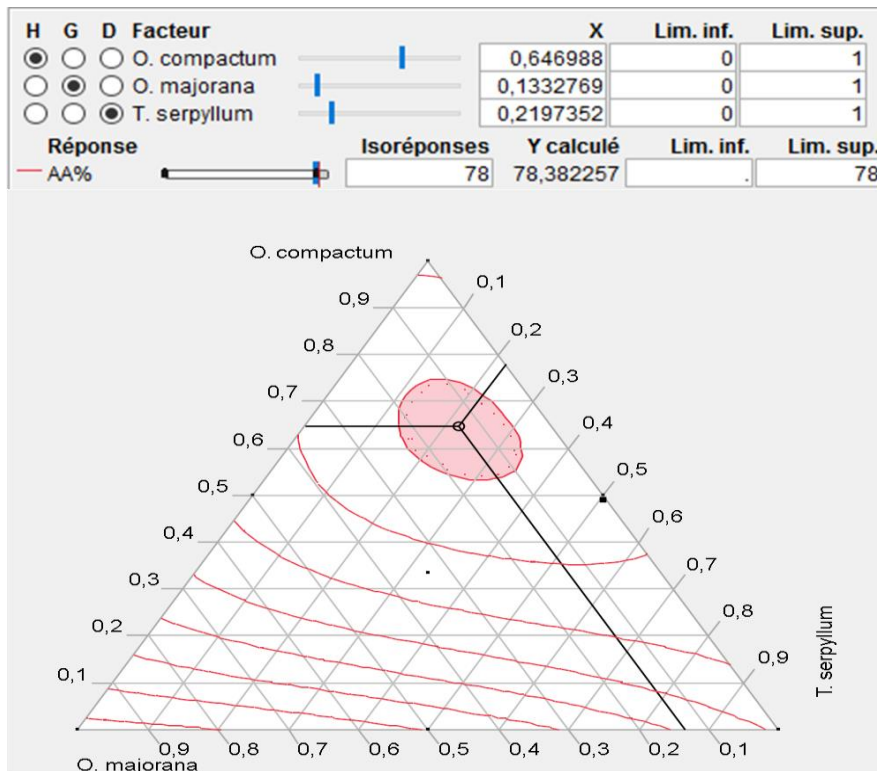


Figure 61: Profileur du mélange 1 pour AA=78%

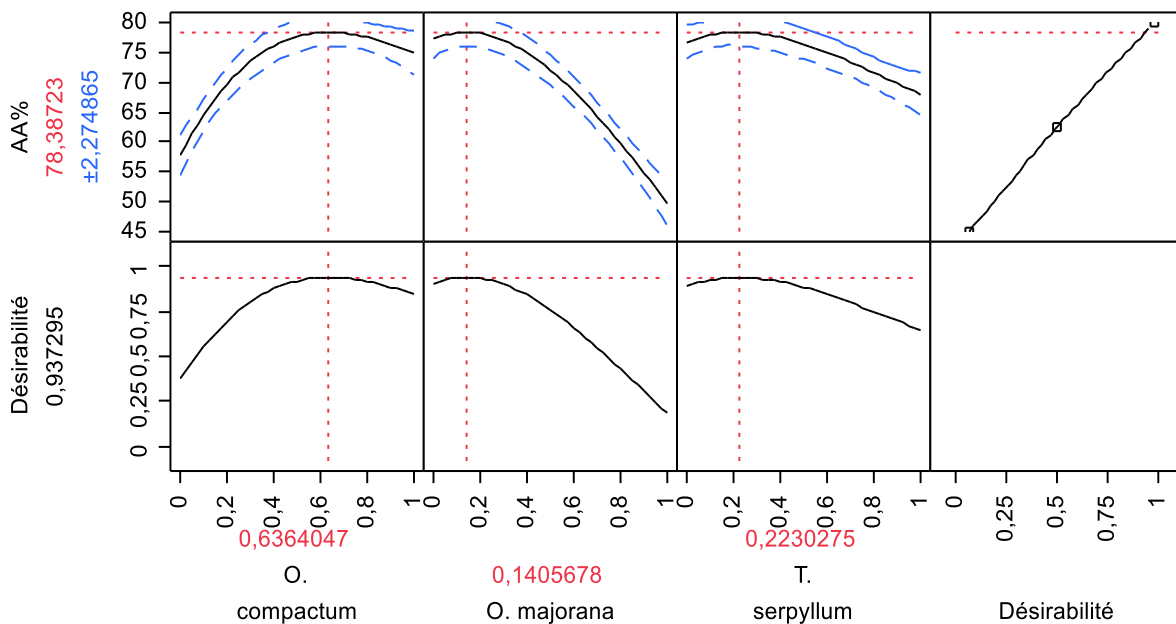


Figure 62: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 1

2.2.Mélange 2 : *Origanum majorana*/*Thymus serpyllum*/ *Mentha spicata*

2.2.1. Réponses

Les réponses obtenues pour toutes les expériences proposées par le logiciel sont rassemblées dans le tableau (64), ainsi que la matrice utilisée pour la formulation.

Tableau 64: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 2

N° d'expérience	Huiles essentielles (%) v			AA%
	O. majorana	T. serpyllum	M. spicata	
1	0	50	50	55,04
2	50	0	50	79,55
3	33,333333	33,333333	33,333333	74,74
4	100	0	0	47,30
5	0	50	50	56,04
6	0	100	0	69,63
7	50	50	0	71,49
8	0	0	100	72,49
9	50	50	0	74,48
10	50	0	50	73,91
11	0	0	100	77,32
12	100	0	0	52,32
13	33,333333	33,333333	33,333333	73,31
14	0	100	0	66,41
15	33,333333	33,333333	33,333333	73,31

2.2.2. Validation statistique

D'après le tableau (65), la probabilité de la signification du risque *p-value* inférieure à 0,05 permet de conclure que l'effet principale de la régression linéaire est significatif. Le $R^2 = 0,96$, cette valeur témoigne la bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et celle calculées, figure (63).

Tableau 65: Analyse de la variance pour le modèle postulé du mélange 2

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	<i>p-value</i>
Modèle	6	1369,8232	228,304	35,2854	<,0001*
Résidus	8	51,7616	6,47		
Total	14	1421,5848			
R ²	0,96				
R ² ajusté	0,93				

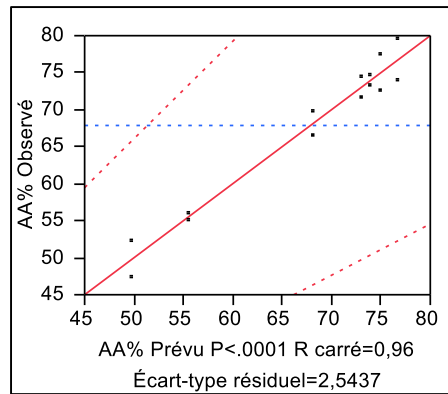


Figure 63: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 2

2.2.3. Etude des résidus

Le tableau (66), représente les résidus calculés pour le mélange 2, des différences négligeables ont été observées.

Tableau 66: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculé par le modèle du mélange2

N°Exp	Yexp	Ycalc	Difference
1	52.320	49.810	2.510
2	47.300	49.810	-2.510
3	69.630	68.020	1.610
4	66.410	68.020	-1.610
5	77.300	74.890	2.410
6	72.480	74.890	-2.410
7	71.490	72.985	-1.495
8	74.480	72.985	1.495
9	73.900	76.725	-2.825
10	79.550	76.725	2.825
11	55.040	55.535	-0.495
12	56.030	55.535	0.495
13	73.300	74.260	-0.960
14	74.740	74.260	0.480
15	74.740	74.260	0.480

2.2.4. Estimation des coefficients

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (67). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;
- les termes binaires b_{12} , b_{13} , et b_{23} .

Ces résultats affirment que l'activité antioxydante dépend de tous les termes du modèle mathématique adapté, sauf celui traduisant l'interaction ternaire.

Tableau 67: Effets des coefficients du modèle du mélange 2 qui relie la réponse aux facteurs

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	Rapport t	p-value
<i>O. majorana</i>	b_1	49,81	1,798638	27,69	<,0001*
<i>T. serpyllum</i>	b_2	68,02228	1,798638	37,82	<,0001*
<i>M. spicata</i>	b_3	74,904624	1,798638	41,65	<,0001*
<i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i>	b_{12}	56,293322	8,811493	6,39	0,0002*
<i>O. majorana</i> * <i>M. spicata</i>	b_{13}	57,483617	8,811493	6,52	0,0002*
<i>T. serpyllum</i> * <i>M. spicata</i>	b_{23}	-63,69602	8,811493	-7,23	<,0001*
<i>O. majorana</i> * <i>T. serpyllum</i> * <i>M. spicata</i>	b_{123}	107,40345	55,29168	1,94	0,0880

2.2.5. Modèle mathématique et représentation 3D

Le modèle mathématique retenu par le mélange 2 est représenté par l'équation Eq12

$$y = 49,810m + 68,02Ts + 74,90Ms + 56,290mTs + 57,480mMs - 63,69TsMs \text{ Eq12}$$

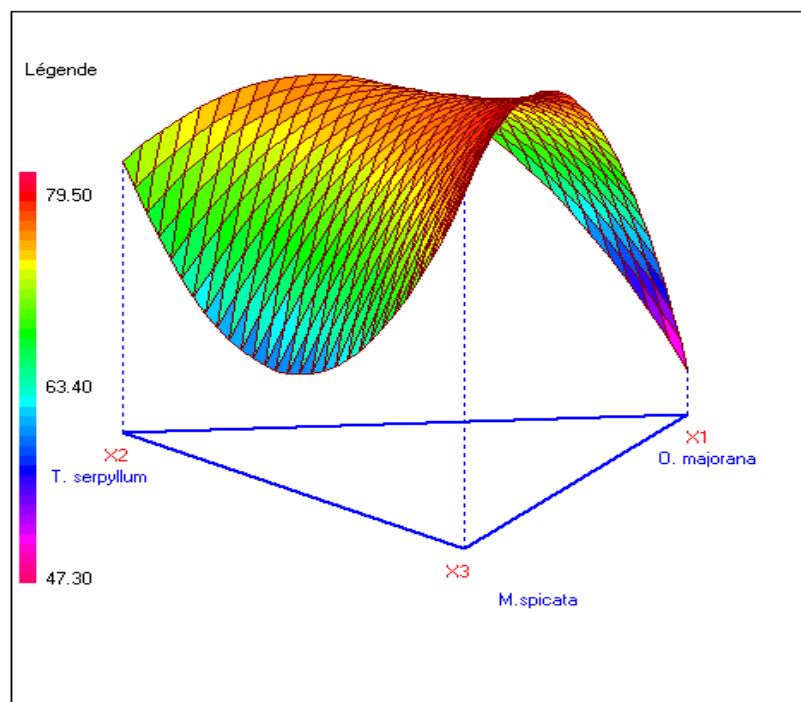


Figure 64: Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 2

2.2.6. Point-test

Pour finaliser les tests de la validité du modèle retenu, nous nous sommes servis de l'outil point test. Ainsi, nous avons réalisé un essai dont le résultat correspond à la réponse souhaitée. Les coordonnées du point test sont : $X_1=0,16667$; $X_2=0,16667$; $X_3=0,66667$ ont permis l'obtention d'une inhibition radicalaire de 70,12%, une valeur qui est très proche de celle obtenue par le modèle mathématique équivalent à 72,47%.

2.2.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

Le profilier du mélange sur la figure (65) illustre la zone rose rassemblant les mélanges susceptibles à donner une activité antioxydante supérieure à 78%. L'étude désirabilité a montré que l'optimum de l'activité antioxydante à aboutir est de 79,46% avec un mélange de 0,28 de l'huile de la marjolaine et 0,71 de la menthe vert.

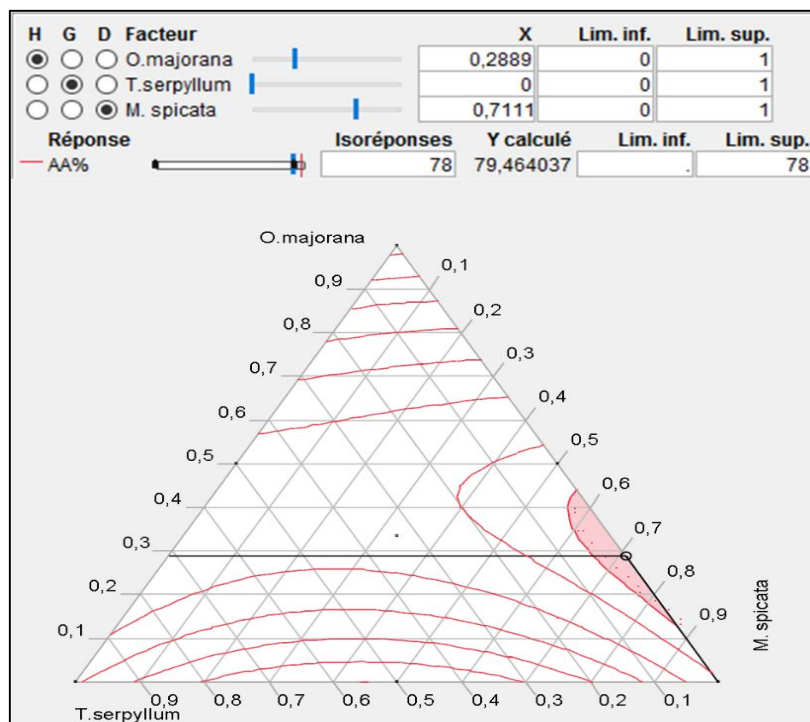


Figure 65: Profilier de mélange 2 pour AA=78%

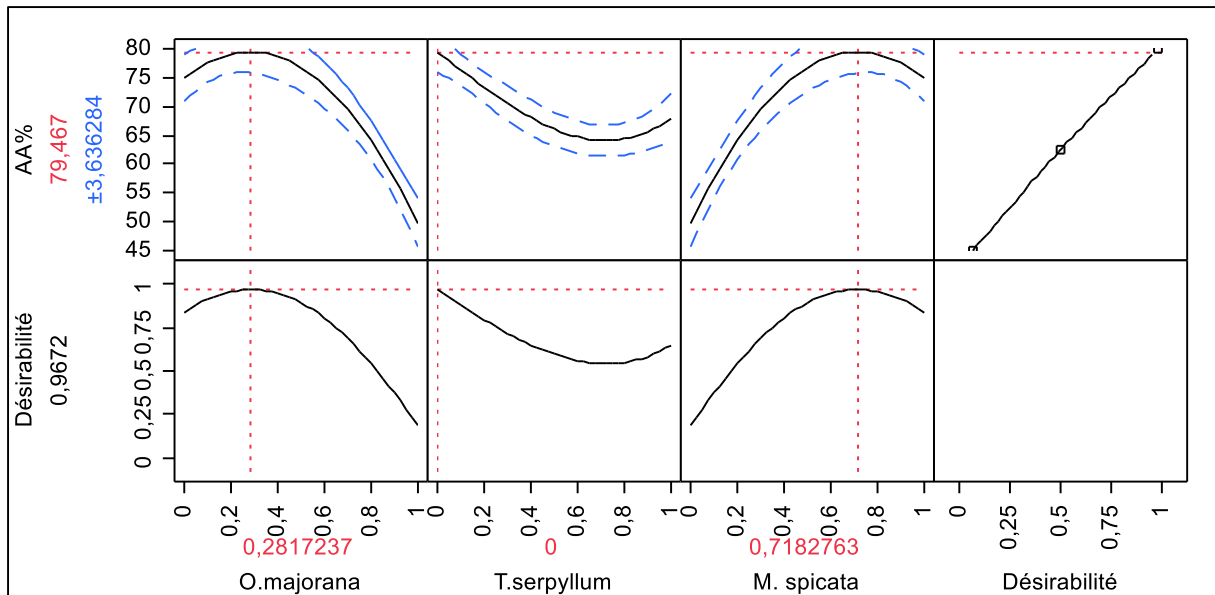


Figure 66: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 2

2.3. Mélange 3 : *Myrtus communis*/ *Artemisia herba-alba*/ *Thymus serpyllum*

2.3.1. Réponses

La matrice d'expérimentation, ainsi que l'activité antioxydante obtenue pour chaque expérience sont présents sur le tableau (68).

Tableau 68: Matrice d'expérimentation et réponses expérimentales du mélange 3

N° d'expérience	Huiles essentielles (%) v			AA%
	<i>M. communis</i>	<i>A. herba-alba</i>	<i>T. serpyllum</i>	
1	50	0	50	40,93
2	100	0	0	78,50
3	100	0	0	75,42
4	50	50	0	8,15
5	33,333333	33,333333	33,333333	33,68
6	0	0	100	69,63
7	0	100	0	45,73
8	0	0	100	66,41
9	0	100	0	46,02
10	50	50	0	5,17
11	50	0	50	46,65
12	0	50	50	45,60
13	33,333333	33,333333	33,333333	36,58
14	0	50	50	49,29
15	33,333333	33,333333	33,333333	36,58

2.3.2. Validation statistique

D'après le tableau (69), on peut dire que l'effet principale de la régression linéaire est significatif, vu que la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0,05. Le coefficient de détermination $R^2 = 0,99$, une valeur exceptionnellement satisfaisante pour décrire la haute corrélation entre les valeurs observées et les valeurs calculées prédites par le modèle.

Tableau 69: Analyse de la variance pour le modèle postulé du mélange 3

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p -value
Modèle	6	6317,3120	1052,89	194,9703	<,0001*
Résidus	8	43,2019	5,40		
Total	14	6360,5139			
R^2	0,99				
R^2 ajusté	0,98				

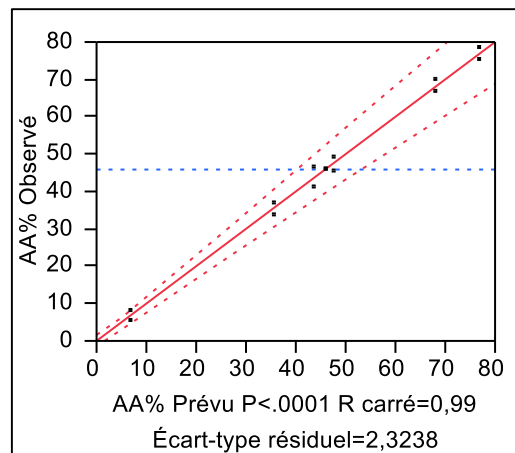


Figure 67: Courbe des valeurs d'activité antioxydante observées en fonction des valeurs calculées pour le plan de mélange 3

2.3.3. Etude des résidus

Le tableau (70), représente les résidus calculés pour l'activité antioxydante du mélange 3, des différences négligeables ont été observées

Tableau 70: Résidus entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculé par le modèle du mélange 3

N°Exp	Yexp	Ycalc	Différence
1	78.490	76.950	1.540
2	75.410	76.950	-1.540
3	45.730	45.875	-0.145
4	46.020	45.875	0.145
5	69.630	68.020	1.610
6	66.410	68.020	-1.610
7	5.170	6.655	-1.485
8	8.140	6.655	1.485
9	40.920	43.785	-2.865
10	46.650	43.785	2.865
11	45.590	47.440	-1.850
12	49.290	47.440	1.850
13	33.670	35.603	-1.933
14	36.570	35.603	0.967
15	36.570	35.603	0.967

2.3.4. Estimation des coefficient

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (*p-value*) sont rassemblés dans le tableau (71). D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- les termes linéaires b_1 , b_2 et b_3 ;
- les termes binaires b_{12} , b_{13} et b_{23}
- le terme ternaire b_{123} .

Ces résultats affirment que l'activité antibactérienne contre *B. subtilis* dépend de tous les termes du modèle mathématique adapté, sauf celui traduisant l'interaction entre le serpolet et l'armoise.

Tableau 71: Effets des coefficients du modèle du mélange 3 qui relie la réponse aux facteurs

Terme	Coefficient	Estimation	Écart-type	t-student	p-value
M.communis	b_1	76,957119	1,643203	46,83	<,0001*
A.herba-alba	b_2	45,87975	1,643203	27,92	<,0001*
T.serpyllum	b_3	68,02228	1,643203	41,40	<,0001*
M.communis*A.herba-alba	b_{12}	-219,0295	8,050019	-27,21	<,0001*
M.communis*T.serpyllum	b_{13}	-114,8024	8,050019	-14,26	<,0001*
A.herba-alba*T.serpyllum	b_{23}	-38,02838	8,050019	-4,72	0,0015*
M.communis*A.herba-alba*T.serpyllum	b_{123}	359,37738	50,51347	7,11	0,0001*

2.3.5. Modèle mathématique retenus et représentation 3D

Le modèle mathématique retenu pour l'activité antioxydante du mélange 3 est représenté par l'équation Eq13.

$$y = 76,95Mc + 45,87Aha + 68,02Ts - 219,02McAha - 114,80McTs - 38,02AhaTs + 359McAhaTs \quad \text{Eq13}$$

La figure (68) illustre la représentation 3D du mélange 3, où la variation de l'activité antioxydante apparaît concrètement.

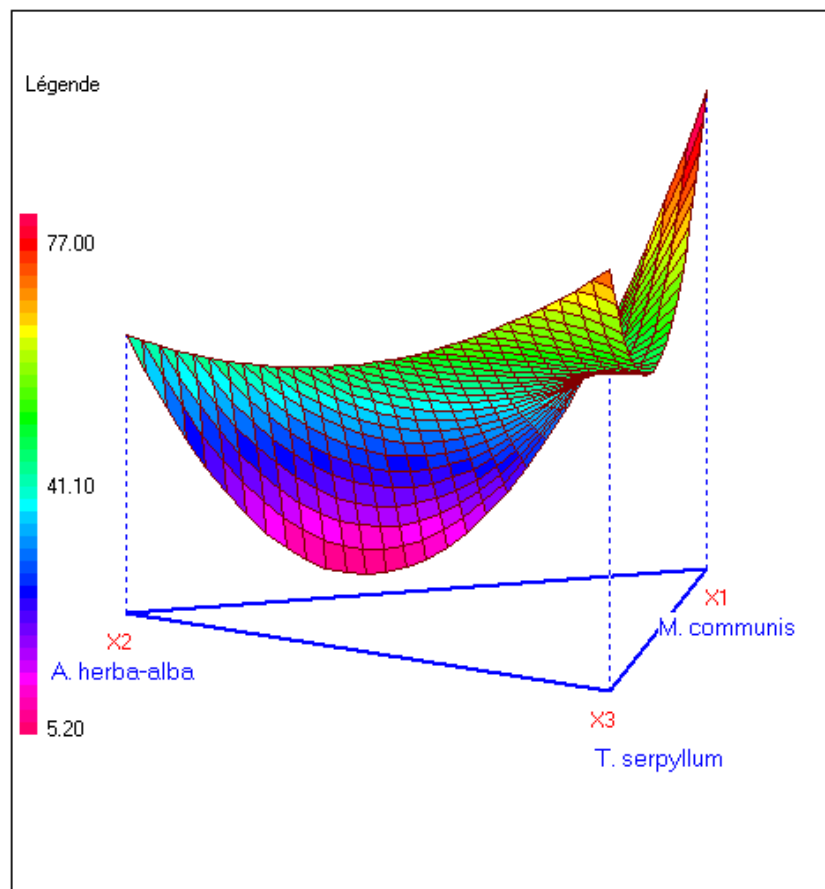


Figure 68: Représentation 3D de l'activité antioxydante du mélange 3

2.3.6. Point-test

Pour finaliser les tests de la validité du modèle retenu, nous nous sommes servis de l'outil point test. Ainsi, nous avons réalisé un essai dont le résultat correspond à la réponse souhaitée. Les coordonnées du point test sont : $X1=0,16667$; $X2=0,16667$; $X3=0,66667$ ont permis l'obtention d'une inhibition radicalaire de 52%, une valeur qui est très proche de celle obtenue par le modèle mathématique équivaut à 49,43%.

2.3.7. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

Le profileur du mélange sur la figure (60) illustre la zone permettant d'obtenir une activité antioxydante supérieure à 70%. Aucun mélange n'est qualifié capable de donner un effet antioxydant meilleur que l'huile du myrte seule, où l'activité atteint 76,95% ,(figure 70).

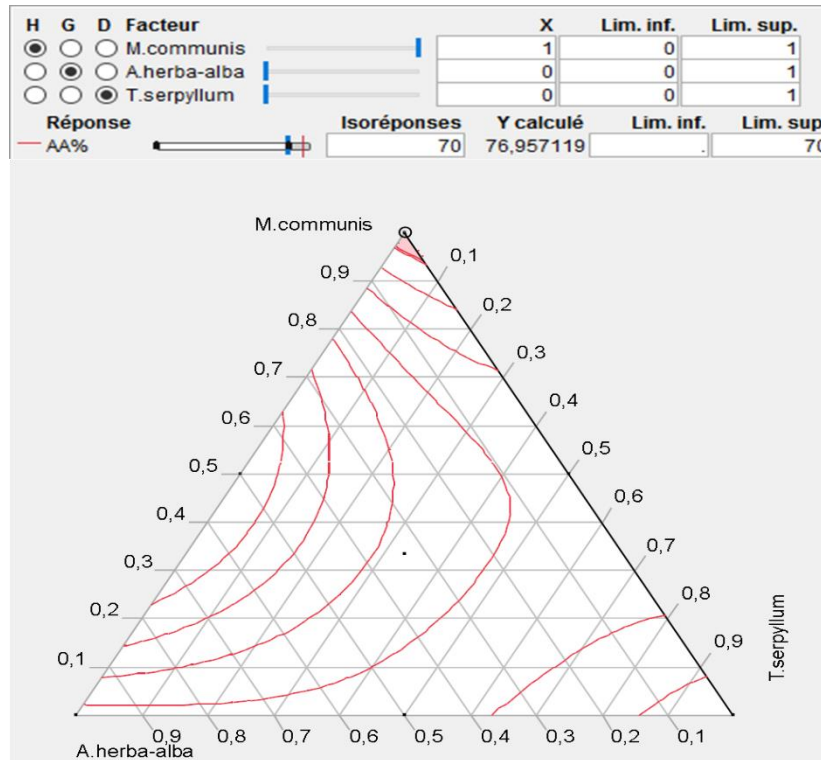


Figure 69: Profileur de mélange 3 pour AA=70%

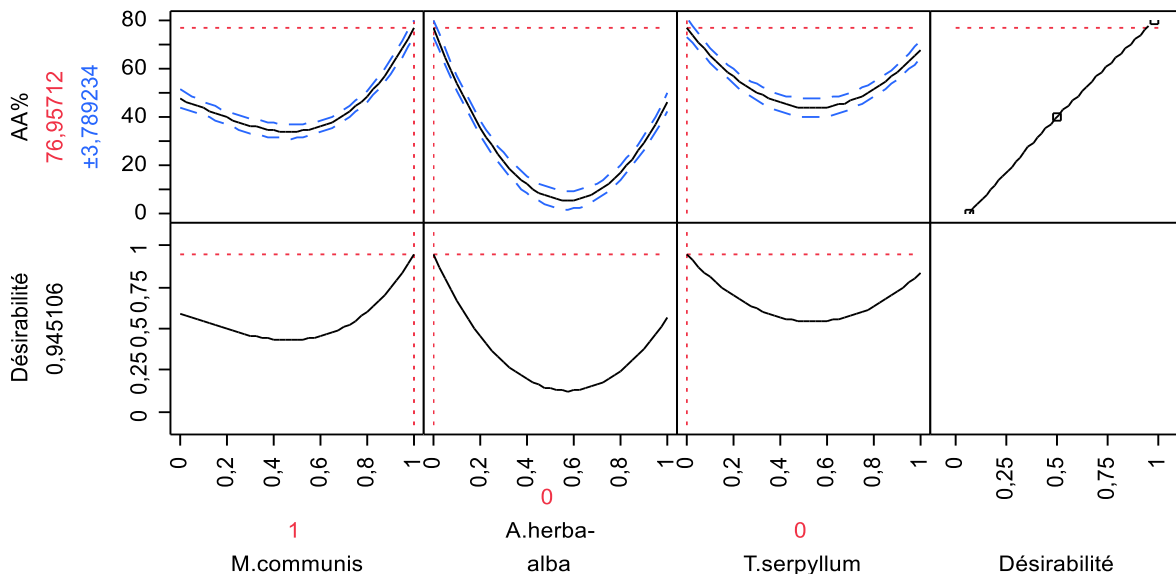


Figure 70: Profil de désirabilité des proportions optimales relatives à l'activité antioxydante du mélange 3

2.4. Discussion des mélanges ternaires : activité antioxydante

Les trois mélanges dont l'activité antibactérienne a été évaluée, ont été aussi évalués pour leur effet antioxydant. En effet, L'interaction entre les HEs dans le cas de l'activité antioxydante a été déjà observée par d'autres auteurs, et un phénomène de synergie ou d'antagonisme a été mis en évidence. En fait, des combinaisons binaires des HEs de *Brassica nigra*, de *Cuminum cyminum*, et de *Coriandrum sativum* ont montré des interactions synergiques et additive pour la réduction du radicale libre DPPH [245]. Ainsi, Bag *et al*, ont testé une combinaison de l'HE d'*Angelica archangelica*, l'alcool de Phenyl ethyl et de α -terpineol, un effet antioxydant potentiel a été obtenu avec une valeur de CI50 de 3.89 $\mu\text{L}/\text{mL}$ [235].

L'interaction entre les antioxydants synthétiques a été aussi évaluée par Yi *et al* [247], qui ont illustré l'effet de synergie existant entre le tocophérol et l'acide ascorbique. Ainsi, Kurechi *et Kato* [248] ont prouvé l'effet de synergie entre le butylhydroxyanisole BHA et le butylhydroxytoluène BHT sur le radical libre DPPH. Un mélange ternaire de BHA, terbutylhydroquinone TBHQ et le BHT, a été soumis à la méthode des plans de mélange pour évaluer la stabilité d'oxydation du biodiesel B100. Cette étude a mis en exergue l'interaction synergique produite par le mélange binaire du BHA et TBHQ qui est le mélange le plus efficace pour la protection du biodiesel B100 de l'oxydation[233].

Dans le premier mélange, l'interaction entre l'huile de l'origan avec celle de la marjolaine, ainsi son interaction avec celle du serpolet ont été significatives, et influence positivement l'activité antioxydante de ce mélange. Dans le deuxième mélange, l'interaction de l'huile de la marjolaine avec celle du serpolet et avec celle de la menthe ont été significatives et elles ont influencé positivement son effet antioxydant. Cependant que, l'interaction de l'huile de serpolet avec la menthe a été significative, mais elle a influencé négativement l'effet antioxydant. En revanche, Dans le troisième toutes les interactions binaires entre le myrte, l'armoise et le serpolet, influence négativement l'effet antioxydant de ce mélange, contrairement à l'effet ternaire.

Ces interactions est principalement dû au profil chimique de chaque HE. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. En effet, l'interaction entre le carvacrol et le thymol a montré son effet antioxydant synergique quand il a été testée par l'équipe de Llana-Ruiz-Cabello [249]. Bien qu'ils ne procèdent pas le même mécanisme d'action comme il a été montré par Yanishlieva *et al* [250]. Le γ -terpinène ayant une structure de cyclohexadiène, agissent comme antioxydant grâce à son auto-oxydation [89]. Il a montré aussi son effet synergique une fois mélangé avec la rutine qui est un polyphénol [251]. Le monoterpène p-

cymene, est considéré comme un antioxydant substantiel, il a déjà montré un effet antioxydant synergique avec le thymol et/ou le carvacrol, cependant qu'il a montré un effet antagoniste avec la thymoquinone. Toutefois, ce dernier mélange a produit un effet antioxydant synergique une fois ajouté au thymol et/ou carvacrol [252].

Des études antérieures ont aussi participé à l'explication de la synergie entre les HEs. En fait, ils ont rapporté que les doubles liaisons carbone-carbone insaturées ($C = C$) sont capables d'inhiber les réactions radicalaires en attirant des électrons simples à partir de radicaux libres pour former un système de nuage d'électrons stable [253]. D'autres, classent les antioxydants en ceux primaires qui perturbent la réaction en chaîne oxydante des radicaux libres en faisant don d'électrons ou d'atomes d'hydrogène des groupes hydroxylés phénoliques et, par conséquent, stabilisent les radicaux libres lipidiques, inhibent ou ralentissent la phase d'initiation et perturbent le stade de propagation de l'auto-oxydation, et en ceux secondaires qui désactivent l'oxygène singulet, les ions métalliques chélatés, absorbent le rayonnement ultraviolet, éliminent l'oxygène et aident à régénérer les antioxydants primaires. Ils axiomatisent la synergie antioxydante dans la combinaison des antioxydants primaires avec ceux secondaires [254].

IV. Conclusion

Toutes les HEs ont montré des propriétés antioxydantes avec des degrés différents d'activité anti-radicalaire. Les HEs de *T. serpyllum*, *M. spicata* et *M. communis* ont l'activité antioxydante la plus élevée. Cette activité peut être principalement attribuée à la présence des composés comme le Thymol, le carvacrol, le γ -terpinène, le p-cymène, le 1,8 cineol, le linalool...

Dans ce dernier chapitre, nous avons élaboré aussi des formulations à activité antioxydante en nous servant des plans de mélanges. Cette propriété a été liée aussi à la composition chimique. En effet, la combinaison du serpolet avec d'autres HEs de composition différente a changé la voie des interactions, et a influencé, par conséquent, l'effet antioxydant obtenu.

Conclusion générale

Cette thèse a pour objectif principale la contribution à la valorisation des HEs de la région de Taounate. En fait, les HEs constituent un groupe numériquement vaste économiquement important. Elles contiennent des composants actifs utilisés dans le traitement de diverses maladies. Outre leur utilisation comme remèdes, on les emploie aussi dans les industries pharmaceutique, alimentaire, les cosmétiques et les parfums.

Pour réaliser notre but, nous avons considéré que la détermination de la composition chimique servira comme un chimio-guidage pour orienter l'étude. Pour cela, Les HEs ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un clevenger. La composition chimique des HEs extraites a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

Dans cette partie, il ressort que les plantes étudiées ont des rendements moyens en HEs. Des rendements allant de 0,4% pour le *P. asperum* jusqu'à 1,85% dans le zest du *C. aurantium*. Les résultats de l'analyse de la composition chimique indiquent : une grande teneur en monoterpène qui dépasse 50% dans toutes les HEs et une richesse en composés ayant le pouvoir antibactérien et antioxydant.

La composition chimique des HEs nous a encouragé à cribler leurs activité antibactérienne (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) et antioxydante (DPPH). Effectivement, les deux activités ont été mises en évidence. Soulignons que l'intensité de l'effet a été principalement liée au ratio des phénols, alcools, aldéhydes, éthers,...etc.

Par ailleurs, les interactions avec les matrices alimentaires, doses toxiques, détérioration de la qualité organoleptique : problèmes qui demande des huiles efficaces, pour utiliser juste de petite doses et obtenir un effet similaire à celui obtenu *in-vitro*. En conséquence, avoir recours à la combinaison des HE comme alternatif améliorant l'effet antibactérien des huiles nous a permis :

✓ Au niveau des mélanges binaire :

Tester quatre combinaisons en utilisant la méthode de damier « chackerboard » :

- *O. mjojana*/*T. serpyllum*
- *O. majorana*/*L. dentata*
- *P. asperum*/*O. mixta*
- *C. aurantium* zest/*C. aurantium* feuilles

Ce qui a permis de déterminer plus que vingt formules ayant un pouvoir antibactérien meilleur que celui des huiles seules contre les quatre souches étudiées.

✓ Au niveau des mélanges ternaires :

Une nouvelle méthode étudiant l'effet antibactérien combinatoire a été développée, basée sur la détermination de la CMI qui est une méthode standardisée, et modélisée à l'aide des plans d'expériences de type « plans de mélanges ».

L'effet antibactérien de trois mélanges a été modélisé :

- *O. compactum/O. majorana/T. serpyllum*
- *O. majorana/M. spicata/T. serpyllum*
- *M. communis/A. herba-alba/T. serpyllum*

L'évaluation de l'activité antibactérienne des mélanges tertiaires des HE contre les souches testées, par la détermination de la CMI en adoptant la méthode des plans de mélanges du type centré augmenté, nous a permis de modéliser et valider statistiquement ainsi que d'établir un profil de prédiction du phénomène étudié.

Afin de renforcer les mélanges dont l'effet antibactérien a été modélisé, on a eu recours à la modélisation de leur effet antioxydant. De ce fait, le choix d'une formule optimale en son effet antibactérien et antioxydant sera mieux orienté selon la destination de la formule.

A l'issue des résultats obtenus tout au long de cette thèse, plusieurs pistes de recherche sont à notre portée et méritent d'être entamées.

- Cribler l'effet antimicrobien des HEs étudiées sur plusieurs germes, et tester l'effet des mélanges déjà modélisés sur ces nouveaux germes ;
- Tester les effets antibactérien et antioxydants combinatoire des composés majoritaires des huiles combinées ;
- Développer un produit fini à base des formules trouvées ;
- Tester d'autres combinaisons à partir des HEs étudiées.

Références

- [1] P. Franchomme, R. Jollois, and D. Pénoel, *l'aromathérapie exactement*, 1st ed. 2001.
- [2] J. Buckle, "The Evolution of Aromatherapy," in *Clinical aromatherapy Essential oils in healthcare*, 3rd ed., J. Buckle, Ed. London: Elsevier, 2015, pp. 2–13.
- [3] USAID, "Stratégie nationale de développement du secteur des Plantes Aromatiques et Médicinales au Maroc," 2008.
- [4] D. Bousta and A. Ennabili, "L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc," *Phytotherapie*, vol. 9, no. 5, pp. 297–303, 2011.
- [5] Y. Li, A.-S. Fabiano-Tixier, and F. Chemat, *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*, 1st ed. New York: Springer International Publishing, 2014.
- [6] M. Fennane and M. IBN Tattou, "Statistiques et commentaires sur l'inventaire actuel de la flore vasculaire du Maroc," *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, vol. 34, no. 1, pp. 1–9, 2012.
- [7] J. S. Raut and S. M. Karuppayil, "A status review on the medicinal properties of essential oils," *Industrial Crops & Products*, vol. 62, pp. 250–264, 2014.
- [8] A. Neffati, I. Skandrani, M. Ben Sghaier, I. Bouhlel, S. Kilani, and G. Kamel, "Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia*," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 20, pp. 471–478, 2008.
- [9] A. Ait-Ouazzou, S. Lorán, A. Arakrak, A. Laglaoui, C. Rota, A. Herrera, R. Pagán, and P. Conchello, "Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco," *Food Research International*, vol. 45, no. 1, pp. 313–319, Jan. 2012.
- [10] J. Chalchat, "Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb," vol. 110, pp. 501–503, 2008.

- [11] F. Deba, T. D. Xuan, M. Yasuda, and S. Tawata, "Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*," *Food Control*, vol. 19, pp. 346–352, 2008.
- [12] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E. H. A. Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F. N. R. Renaud, and A. Elaissari, "Essential oils: From extraction to encapsulation," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 483, no. 1–2, pp. 220–243, 2015.
- [13] A. Sulborska, E. Weryszko-Chmielewska, and M. Chwil, "Micromorphology of *Rosa rugosa* Thunb. petal epidermis secreting fragrant substances," *Acta Agrobotanica*, vol. 65, no. 4, pp. 21–28, 2012.
- [14] G. W. Turner, J. Gershenzon, and R. B. Croteau, "Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint.," *Plant physiology*, vol. 124, no. 2, pp. 655–664, 2000.
- [15] A. K. Osman, "Trichome micromorphology of Egyptian ballota (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication," *Pakistan Journal of Botany*, vol. 44, no. 1, pp. 33–46, 2012.
- [16] A. Rezakhanlo and S. M. Talebi, "Trichomes morphology of *stachys lavandulifolia* vahl. (Labiatae) of Iran," *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 3755–3763, 2010.
- [17] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils--a review.," *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 46, no. 2, pp. 446–75, Feb. 2008.
- [18] V. K. Bajpai, S. Shukla, and A. Sharma, "Essential Oils as Antimicrobial Agents," in *Natural Products*, 1st ed., K. . Ramawat and J. . Mérillon, Eds. Berlin: Springer-verlag, 2013, pp. 3975–3988.
- [19] A. Elouaddari, A. El Amrani, J. J. Eddine, A. I. D. Correia, J. G. Barroso, L. G. Pedro, A. C. Figueiredo, and A. Cristina Figueiredo, "Yield and chemical composition of the essential oil of Moroccan chamomile [*Cladanthus mixtus* (L.) Chevall.] growing wild at different sites in Morocco," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 28, no. 6, pp. 360–

- 366, Mar. 2013.
- [20] I. Jerkovic, A. Radonic, and I. Borcic, "(L.) During a One-Year Vegetative Cycle," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 14, no. October 2014, pp. 266–270, 2002.
- [21] I. Ellouze, M. Abderrabba, N. Sabaou, F. Mathieu, A. Lebrihi, and J. Bouajila, "Season's variation impact on Citrus aurantium leaves essential oil: chemical composition and biological activities.," *Journal of food science*, vol. 77, no. 9, pp. T173-80, Sep. 2012.
- [22] M. E. Lucchesi, F. Chemat, and J. Smadja, "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1043, pp. 323–327, 2004.
- [23] O. Baritoux, H. Richard, J. Touche, and M. Derbesy, "Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L.," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 7, no. March, pp. 267–271, 1992.
- [24] K. Knobloch, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand, and N. Weis, "Journal of Essential Oil Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components," no. September 2013, pp. 37–41, 1989.
- [25] R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote, and G. J. E. Nychas, "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 453–462, 2001.
- [26] B. K. Tiwari, V. P. Valdramidis, C. P. O' Donnell, M. Kasiviswanathan, P. Bourke, and P. J. Cullen, "Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation," *agricultural and food chemistry*, vol. 57, no. 14, pp. 5987–6000, 2009.
- [27] R. Tisserand and R. Young, "Kinetics and dosing," in *Essential Oil Safety*, 2nd ed., R. Tisserand and R. Young, Eds. Elsevier, 2014, pp. 39–67.
- [28] R. Tisserand and R. Young, "Toxicity," in *Essential Oil Safety*, 2nd ed., R. Tisserand and R. Young, Eds. London: Elsevier, 2014, pp. 23–38.
- [29] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review.," *International journal of food microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, Aug. 2004.

- [30] I. H. N. Bassolé and H. R. Juliani, “Essential oils in combination and their antimicrobial properties.,” *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 3989–4006, Jan. 2012.
- [31] K. Palaniappan and R. A. Holley, “Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria.,” *International journal of food microbiology*, vol. 140, no. 2–3, pp. 164–8, Jun. 2010.
- [32] V. Pereira, C. Dias, M. C. Vasconcelos, E. Rosa, and M. J. Saavedra, “Antibacterial activity and synergistic effects between Eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*),” *Industrial Crops and Products*, vol. 52, pp. 1–7, 2014.
- [33] F. A. Al-Bayati, “Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts.,” *Journal of ethnopharmacology*, vol. 116, no. 3, pp. 403–406, Mar. 2008.
- [34] N. Bonnard, M. Brondeau, and M. Falcy, “Dipentène ou D , L-Limonène,” 2016. [Online]. Available: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_227.
- [35] M. Vigan, “Essential oils: Renewal of interest and toxicity,” *European Journal of Dermatology*, vol. 20, no. 6, pp. 685–692, 2010.
- [36] R. Tisserand and R. Young, “Constituent profiles,” in *Essential Oil Safety*, 2nd ed., R. Tisserand and R. Young, Eds. London: Elsevier, 2014, pp. 483–647.
- [37] W. S. Itani, S. H. El-banna, S. B. Hassan, R. L. Larsson, H. U. Gali-muhtasib, W. S. Itani, S. H. El-banna, S. B. Hassan, and R. L. Larsson, “Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis,” vol. 4047, no. May 2016, 2008.
- [38] J. D. Guin, B. N. Meyer, D. Ph, and R. D. Drake, “The effect of quenching agents on contact urticaria caused by cinnamic aldehyde,” vol. 10, no. 1, pp. 429–434, 1984.
- [39] J. Wright, “Essential oils,” in *Food Flavourings*, 1st ed., P. R. Ashurst, Ed. New york, 1991, pp. 24–53.
- [40] R. Liu and B. Xu, “Characterization of Essential Oil in Pine Nut Shells from Commodity Waste in China by Steam Distillation and GC-MS,” *Food Analytical*

- Methods*, vol. 5, no. 3, pp. 435–440, 2011.
- [41] M. Godefroot, P. Sandra, and M. Verzele, “New method for quantitative essential oil analysis,” *Journal of Chromatography A*, vol. 203, no. 198 1, pp. 325–335, 1981.
- [42] J. Kaloustian and F. Hadji-Minaglou, *La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Newyork, 2012.
- [43] A. Lamarti, A. Badoc, and J.-P. Carde, “Étude chromatographique de l’huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* mill.); Caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants,” *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, vol. 132, pp. 73–89, 1993.
- [44] C. M. Cook and T. Lanaras, “Essential Oils: Isolation, Production and Uses,” in *Encyclopedia of Food and Health*, 1st ed., B. Caballero, P. Finglas, and F. Toldra, Eds. Elsevier, 2016, pp. 552–557.
- [45] G. Cravotto and F. Chemat, *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, 1st ed. New york: Springer, 2013.
- [46] T. Allaf and K. Allaf, *Instant Controlled Pressure Drop (D.I.C.) in Food Processing*. 2014.
- [47] F. Shafizadeh, “Industrial pyrolysis of cellulosic materials,” in *Applied Polymer Symposium*, 1975, vol. 378, pp. 153–174.
- [48] A. Ammann, D. C. Hinz, R. S. Addleman, C. M. Wai, and B. W. Wenclawiak, “Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil,” *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*, vol. 364, no. 7, pp. 650–653, 1999.
- [49] Y. Zhannan, L. Shiqiong, P. Quancai, Z. Chao, and Y. Zhengwen, “GC-MS Analysis of the Essential Oil of Coral Ginger (*Zingiber corallinum* Hance) Rhizome Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Steam Distillation Extraction,” *Chromatographia*, vol. 69, no. 7–8, pp. 785–790, 2009.
- [50] M. Z. Özel, F. Göğüş, J. F. Hamilton, and A. C. Lewis, “Analysis of volatile components from *Ziziphora taurica* subsp. *Taurica* by steam distillation, superheated-water extraction, and direct thermal desorption with GC×GC-TOFMS,” *Analytical and*

- Bioanalytical Chemistry*, vol. 382, no. 1, pp. 115–119, 2005.
- [51] L. Hernandez-Ochoa, G. Vilarem, Z. Mouloungui, and Y. Medina-Gonzalez, “Comparing the effect of utilization of ethyl heptanoate as co-solvent during extraction of essential oil of *Inula helenium* in a hydrodistillation process,” *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 47, no. 6, pp. 995–997, 2012.
- [52] S. Karakaya, S. N. El, N. Karagozlu, S. Sahin, G. Sumnu, and B. Bayramoglu, “Microwave-Assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. 6, pp. 1056–1065, 2014.
- [53] M. H. S. Sourmaghi, G. Kiaee, F. Golfakhrabadi, H. Jamalifar, and M. Khanavi, “Comparison of essential oil composition and antimicrobial activity of *Coriandrum sativum* L. extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 4, pp. 2452–2457, 2014.
- [54] D. Kalemba and a. Kunicka, “Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 10, pp. 813–829, May 2003.
- [55] R. Tisserand and R. Young, “Essential oil profiles,” in *Essential Oil Safety*, 2nd ed., R. Tisserand and R. Young, Eds. Elsevier, 2014, pp. 183–482.
- [56] F. A. Al-Bayati and M. J. Mohammed, “Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study,” *Pharmaceutical Biology*, vol. 47, no. 1, pp. 61–66, Jan. 2009.
- [57] A. a. Saddiq and S. a. Khayat, “Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral,” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 98, no. 1, pp. 89–93, 2010.
- [58] J. M. Kim, M. R. Marshall, J. a Cornell, J. F. Preston III, and C. I. Wei, “Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella Typhimurium* in culture medium and on Fish Gubes,” *Journal of Food Science*, vol. 60, no. 6, pp. 1364–1674, 1995.
- [59] L. Dhara and A. Tripathi, “Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis,” *European Journal of Integrative Medicine*, vol. 5, no. 6, pp. 527–536, 2013.

- [60] N. G. Heatley, "A method for the assay of penicillin.," *The Biochemical journal*, vol. 38, no. 1, pp. 61–65, 1944.
- [61] D. W. Al Abbasy, N. Pathare, J. N. Al-Sabahi, and S. A. Khan, "Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.)," *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 5, no. 8, pp. 645–649, 2015.
- [62] M. P. Mishra, S. Rath, S. S. Swain, G. Ghosh, D. Das, and R. N. Padhy, "In vitro antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria," *Journal of King Saud University - Science*, 2015.
- [63] A. N. El Gendy, M. Leonardi, L. Mugnaini, F. Bertelloni, V. V. Ebani, S. Nardoni, F. Mancianti, S. Hendawy, E. Omer, and L. Pistelli, "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt," *Industrial Crops and Products*, vol. 67, pp. 201–207, 2015.
- [64] E. L. Ouali, L. Abdelhakim, E. Fouad, and O. Wissal, "Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris* et *Thymus satureioïdis* Thymus essential oils (*Thymus vulagris* and *Thymus satureioïdis*) from center of Morocco ," vol. 8, 2013.
- [65] M. Unlu, E. Ergene, G. V. Unlu, H. S. Zeytinoglu, and N. Vural, "Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae).," *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 48, no. 11, pp. 3274–80, Nov. 2010.
- [66] R. Muhaidat, M. a. Al-Qudah, O. Samir, J. H. Jacob, E. Hussein, I. N. Al-Tarawneh, E. Bsoul, and S. T. Abu Orabi, "Phytochemical investigation and in vitro antibacterial activity of essential oils from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Delile and *C. trinervia* Fresen. (Cleomaceae)," *South African Journal of Botany*, vol. 99, pp. 21–28, 2015.
- [67] N. Gameda, Y. Woldeamanuel, D. Asrat, and A. Debella, "Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, no. Suppl 1, pp. S373–S381, 2014.
- [68] D. C. Mohana and K. a Raveesha, "Anti-fungal evaluation of some plant extracts

- against some plant pathogenic field and storage fungi,” *Journal of Agricultural Technology*, pp. 119–137, 2008.
- [69] V. Kumar and D. Tyagi, “Original Research Article Antifungal activity evaluation of different extracts of *Bergenia stracheyi* Antifungal activity,” vol. 2, no. 7, pp. 69–78, 2013.
- [70] R.-S. Pei, F. Zhou, B.-P. Ji, and J. Xu, “Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method.,” *Journal of food science*, vol. 74, no. 7, pp. M379-83, Sep. 2009.
- [71] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, and P. Bourke, “The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients.,” *International journal of food microbiology*, vol. 124, no. 1, pp. 91–7, May 2008.
- [72] S. Selim, “Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant Enterococci (vre) and *Escherichia coli* O157:H7 feta soft cheese and minced beef meat,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, pp. 187–196, 2011.
- [73] H. J. Dorman and S. G. Deans, “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils,” *Journal of applied microbiology*, vol. 88, no. 2, pp. 308–316, 2000.
- [74] P. J. Delaquis, K. Stanich, B. Girard, and G. Mazza, “Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill , cilantro , coriander and eucalyptus essential oils,” *Food microbiology*, vol. 74, no. 1–2, pp. 101–109, 2002.
- [75] G. A. de Azeredo, T. L. M. Stamford, P. C. Nunes, N. J. Gomes Neto, M. E. G. de Oliveira, and E. L. de Souza, “Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables,” *Food Research International*, vol. 44, no. 5, pp. 1541–1548, Jun. 2011.
- [76] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, and P. Bourke, “The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 124, no. 1, pp. 91–97, 2008.
- [77] I. H. N. Bassolé, A. Lamien-Meda, B. Bayala, S. Tirogo, C. Franz, J. Novak, R. C.

- Nebié, and M. H. Dicko, “Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination.,” *Molecules*, vol. 15, no. 11, pp. 7825–7839, Nov. 2010.
- [78] M. N. Gallucci, M. Oliva, C. Casero, J. Dambolena, A. Luna, and J. Zygadlo, “Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*,” *Flavour and fragrance journal*, vol. 24, no. 6, pp. 348–354, 2009.
- [79] S. Mulyaningsih, F. Sporer, S. Zimmermann, J. Reichling, and M. Wink, “Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens,” *Phytomedicine*, vol. 17, no. 13, pp. 1061–1066, 2010.
- [80] R. Tserennadmid, M. Takó, L. Galgóczy, T. Papp, M. Pesti, C. Vágvölgyi, K. Almássy, and J. Krisch, “Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk,” *International journal of food microbiology*, vol. 144, no. 3, pp. 480–486, Jan. 2011.
- [81] R. L. White, D. S. Burgess, M. Manduru, and J. A. Bosso, “Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy : time-kill , checkerboard , and E test.,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 40, no. 8, pp. 1914–1918, 1996.
- [82] M. Fadli, A. Saad, S. Sayadi, J. Chevalier, N.-E. Mezrioui, J.-M. Pagès, and L. Hassani, “Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics.,” *Phytomedicine*, vol. 19, no. 5, pp. 464–71, Mar. 2012.
- [83] D. F. Basri, C. K. Luoi, A. M. Azmi, and J. Latip, “Evaluation of the Combined Effects of Stilbenoid from *Shorea gibbosa* and Vancomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).,” *Pharmaceuticals*, vol. 5, no. 9, pp. 1032–43, Jan. 2012.
- [84] P. S. X. Yap, S. H. E. Lim, P. H. Cai, and B. C. Y. Yiap, “Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria.,” *Phytomedicine*, vol. 20, no. 8–9, pp. 710–713, Jun. 2013.

- [85] V. Patrone, R. Campana, E. Vittoria, and W. Baffone, “In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*,” *Current microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 237–241, Apr. 2010.
- [86] P. E. Coudron and C. W. Stratton, “Use of Time-Kill Methodology To Assess Antimicrobial Combinations against Metronidazole-Susceptible and Metronidazole-Resistant Strains of *Helicobacter pylori*,” vol. 39, no. 12, pp. 2641–2644, 1995.
- [87] A. M. Pisoschi and A. Pop, “The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 97, pp. 55–74, 2015.
- [88] M. G. Miguel, “Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants . A review . Antioxidants and Oxidation :,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 2009, no. November 2009, pp. 291–312, 2010.
- [89] R. Amorati, M. C. Foti, and L. Valgimigli, “Antioxidant activity of essential oils,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, pp. 10835–10847, 2013.
- [90] H. R. Griffiths, “Antioxidants: Characterization and Analysis,” in *Encyclopedia of Food and Health*, 1st ed., B. Caballero, P. Finglas, and F. Toldra, Eds. Elsevier, 2016, pp. 221–226.
- [91] H. Masutani, R. Otsuki, Y. Yamaguchi, M. Takenaka, N. Kanoh, K. Takatera, Y. Kunimoto, and J. Yodoi, “Fragrant unsaturated aldehydes elicit activation of the Keap1/Nrf2 system leading to the upregulation of thioredoxin expression and protection against oxidative stress,” *Antioxidants & redox signaling*, vol. 11, no. 5, pp. 949–62, 2009.
- [92] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, “Methods for testing antioxidant activity,” *The Analyst*, vol. 127, pp. 183–198, 2002.
- [93] D. Villaño, M. C. Garc, and A. M. Troncoso, “Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition,” vol. 513, pp. 113–118, 2004.
- [94] R. Amorati and L. Valgimigli, “Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants,” *Free Radical Research*, vol. 49, no. October 2014, pp. 1–17, 2015.

- [95] F. Shahidi and Y. Zhong, "Measurement of antioxidant activity," *Journal of Functional Foods*, vol. 18, pp. 757–781, 2015.
- [96] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of " Antioxidant Power "": The FRAP Assay," vol. 76, pp. 70–76, 1996.
- [97] M. D. La Guardia and A. Gonzalvez, *Food Protected Designation of Origin*. 2013.
- [98] J. O. Ragnarsson and T. P. Labuza, "Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity in foods—A review," *Food Chemistry*, vol. 2, no. 4, pp. 291–308, 1977.
- [99] R. J. DeLange and A. N. Glazer, "Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents.," *Analytical biochemistry*, vol. 177, no. 2, pp. 300–6, Mar. 1989.
- [100] W. Tinsson, *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. New York Dordrecht London, 2010.
- [101] J. Goupy and L. Creighton, *Introduction aux plans d'expériences*, 3rd ed. Paris: Dunod, 2006.
- [102] J. Goupy, "Tutoriel: Les plans d'expériences," *Revue MODULAD*, p. 43, 2006.
- [103] S. Karam, "Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt," Limoges, 2004.
- [104] J. Goupy, *Plan d'expérience: les mélanges*. Paris: Dunod, 2000.
- [105] J. Bellakhdar, *plantes médicinales au Maghreb et soins de base précis de phytothérapie moderne*, Le Fennec. Casablanca: Ibis Press, 2006.
- [106] P. Goetz and K. Ghedira, "Thymus serpyllum L. (Lamiaceae): Serpolet," Springer Paris, 2012, pp. 349–356.
- [107] T. K. Lim, "Lavandula dentata," in *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, pp. 186–191.
- [108] K. Ghedira and P. Goetz, "Géranium rosat : Pelargonium graveolens L'Hér. (Géraniaceae)," *Phytotherapie*, vol. 13, no. 3, pp. 197–201, 2015.
- [109] K. Bakhy, O. Benlhabib, A. Bighelli, J. Casanova, and F. Tomi, "Yield and chemical

- variability of the essential oil isolated from aerial parts of wild *Origanum compactum* Benth . From Moroccan Western Rif,” no. August 2016, 2014.
- [110] R. Btissam, R. Rajae, A. Amina, V. Brigitte, and N. Mohamed, “In vitro study of anti-glycation and radical scavenging activities of the essential oils of three plants from Morocco: *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* and *Pelargonium asperum*,” *Pharmacognosy Journal*, vol. 7, no. 2, pp. 124–135, 2015.
- [111] K. Aboukhalid, A. Lamiri, M. Agacka-Mołdoch, T. Doroszewska, A. Douaik, M. Bakha, J. Casanova, F. Tomi, N. Machon, and C. Al Faiz, “Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco,” *Chemistry & Biodiversity*, 2016.
- [112] S. Bouhdid, S. N. Skali, M. Idaomar, A. Zhiri, D. Baudoux, M. Amensour, and J. Abrini, “Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 10, pp. 1563–1570, 2008.
- [113] M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier, and M. Lacroix, “Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat,” *Meat science*, vol. 73, no. 2, pp. 236–44, Jun. 2006.
- [114] B. Chebli, M. Achouri, L. . Idrissi Hassani, and M. Hmamouchi, “Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr.,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 89, no. 1, pp. 165–169, Nov. 2003.
- [115] F. El Babili, J. Bouajila, J. P. Souchard, C. Bertrand, F. Bellvert, I. Fouraste, C. Moulis, and A. Valentin, “Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities,” *Journal of food science*, vol. 76, no. 3, pp. C512-518, Apr. 2011.
- [116] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, “Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, no. 12, pp. 1–24, 2012.
- [117] T. T. Nhu-Trang, H. Casabianca, and M. F. Grenier-Loustalot, “Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ -terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass

- spectrometry,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1132, no. 1–2, pp. 219–227, 2006.
- [118] C. Busatta, R. S. Vidal, A. S. Popiolski, A. J. Mossi, C. Dariva, M. R. A. Rodrigues, F. C. Corazza, M. L. Corazza, J. Vladimir Oliveira, and R. L. Cansian, “Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage,” *Food microbiology*, vol. 25, no. 1, pp. 207–211, Feb. 2008.
- [119] I. E. Orhan, B. Ozcelik, Y. Kan, and M. Kartal, “Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions.,” *Journal of food science*, vol. 76, no. 8, pp. M538-46, Oct. 2011.
- [120] M. E. Komaitis, N. Ifanti-Papatragianni, and E. Melissari-Panagiotou, “Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.),” *Food Chemistry*, vol. 45, no. 2, pp. 117–118, Jan. 1992.
- [121] I. H. Sellami, E. Maamouri, T. Chahed, W. A. Wannes, M. E. Kchouk, and B. Marzouk, “Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.),” *Industrial Crops and Products*, vol. 30, no. 3, pp. 395–402, Nov. 2009.
- [122] R. R. Vera and J. Chane-Ming, “Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island,” *Food Chemistry*, vol. 66, pp. 143–145, Aug. 1999.
- [123] A. Lamiri, S. Lhaloui, B. Benjilali, and M. Berrada, “Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say),” *Field Crops Research*, vol. 71, no. 1, pp. 9–15, Jun. 2001.
- [124] E. Vági, B. Simándi, Á. Suhajda, and É. Héthelyi, “Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide,” *Food Research International*, vol. 38, no. 1, pp. 51–57, Jan. 2005.
- [125] E. Banchio, P. C. Bogino, J. Zygadlo, and W. Giordano, “Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L.,” *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 36, no. 10, pp. 766–771, Oct. 2008.

- [126] A. Koedam, "The Influence of Some Distillation Conditions on Essential Oil Composition," in *Aromatic Plants*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1982, pp. 229–236.
- [127] T. Jyrki, "Composition of the essential oil of sweet majoram obtained by distillation with steam distillation and by extraction and distillation with alcohol-water mixture," *Acta chemica Scandinavica*, vol. 28, pp. 1121–1128, 1974.
- [128] N. Fischer, S. Nitz, and F. Drawert, "Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis moench*)," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 2, no. 2, pp. 55–61, 1987.
- [129] H. Hajlaoui, H. Mighri, M. Aouni, N. Gharsallah, and A. Kadri, "Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil," *Microbial Pathogenesis*, vol. 95, pp. 86–94, 2016.
- [130] I. Rasooli and S. A. Mirmostafa, "Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils.," *Fitoterapia*, vol. 73, pp. 244–50, Jun. 2002.
- [131] F. Sefidkon, M. Dabiri, and S. a. Mirmostafa, "The composition of *Thymus serpyllum* L. Oil," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 16, no. 3, pp. 184–185, 2004.
- [132] M. S. Abu-Darwish, Z. H. Abu Dieyeh, B. Mufeed, a. R. M. Al-Tawaha, and S. Y. a Al-dalain, "Trace element contents and essential oil yields from wild thyme plant (*Thymus serpyllum* L.) grown at different natural variable environments, Jordan," *Journal of Food, Agriculture and Environment*, vol. 7, no. 3–4, pp. 920–924, 2009.
- [133] A. I. Hussain, F. Anwar, S. a. S. Chatha, S. Latif, S. T. H. Sherazi, A. Ahmad, J. Worthington, and S. D. Sarker, "Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora," *Food Science and Technology*, vol. 50, no. 1, pp. 185–192, Jan. 2013.
- [134] M. Nikolić, J. Glamočlija, I. C. F. R. Ferreira, R. C. Calhelha, Â. Fernandes, T. Marković, D. Marković, A. Giweli, and M. Soković, "Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 52, pp. 183–190, Jan. 2014.

- [135] R. S. Verma, R. K. Verma, a Chauhan, and a K. Yadav, “Seasonal Variation in Essential Oil Content and Composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. Cultivated in Uttarakhand Hills.,” *Indian journal of pharmaceutical sciences*, vol. 73, no. 2, pp. 233–5, Mar. 2011.
- [136] E. Cassel, R. M. F. Vargas, N. Martinez, D. Lorenzo, and E. Dellacassa, “Steam distillation modeling for essential oil extraction process,” *Industrial Crops and Products*, vol. 29, no. 1, pp. 171–176, Jan. 2009.
- [137] L. Bousmaha, J. B. Boti, F. A. Bekkara, V. Castola, and J. Casanova, “Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 368–372, Mar. 2006.
- [138] B. Imelouane, A. Elbachiri, M. Ankit, H. Benzeid, and K. Khedid, “Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*,” pp. 113–118, 2009.
- [139] T. Dob, D. Dahmane, B. Tayeb, and C. Chelghoum, “Chemical composition of the essential oil of L. from Algeria,” *International Journal of Aromatherapy*, vol. 15, no. 2, pp. 110–114, 2005.
- [140] C. Sudria, R. M. Cusid, R. Vila, C. Morales, and M. Bonfill, “Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 58, pp. 177–184, 1999.
- [141] B. Imelounae, A. El Bachiri, M. Ankit, K. Khedid, J. . Wathelet, and H. Amhamdi, “Essential oil composition and antimicrobail activity of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Morocco,” *banats journal of biotechnology*, vol. I, no. 2, pp. 48–56, 2010.
- [142] M. Fadli, J.-M. Pagès, N.-E. Mezrioui, A. Abbad, and L. Hassani, “*Artemisia herba-alba* Asso and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils and their capability to restore antibiotics efficacy,” *Industrial Crops and Products*, vol. 89, pp. 399–404, 2016.
- [143] T. Dob and T. Benabdelkader, “Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria,” *Essential oil recherche*, vol. 18, pp. 685–690, 2006.

- [144] J. Yashphe, R. Segal, and A. Breuer, "Antibacterial Activity of artemisia herba alba," *Journal of Pharmaceutical sciences*, vol. 68, no. 7, pp. 924–925, 1979.
- [145] O. Bachrouch, N. Ferjani, S. Haouel, and J. M. Ben Jemâa, "Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian Artemisia essential oils toward two major coleopteran pests," *Industrial Crops and Products*, vol. 65, pp. 127–133, 2015.
- [146] O. Ouachikh, A. Bouyanzer, M. Bouklah, J.-M. Desjobert, J. Costa, B. Hammouti, and L. Majidi, "Application of essential oil of Artemisia herba-alba as green corrosion inhibitor for steel in 0.5M H₂SO₄," *Surface Review and Letters*, vol. 16, no. 1, pp. 49–54, 2009.
- [147] I. E. Orhan, R. Belhattab, F. S. Şenol, a. R. Gülpinar, S. Hoşbaş, and M. Kartal, "Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of Artemisia absinthium, A. herba-alba, A. fragrans, Marrubium vulgare, M. astranicum, Origanum vulgare subsp. glandulosum and essential oil analysis of two Artemisia species," *Industrial Crops and Products*, vol. 32, no. 3, pp. 566–571, Nov. 2010.
- [148] M. M. Hudaib and T. A. Aburjai, "Composition of the Essential Oil from Artemisia herba-alba Grown in Jordan," *Journal of essential oil research*, vol. 18, pp. 301–304, 2006.
- [149] N. Dahmani-Hamzaoui and A. Baaliouamer, "Volatile constituents of Algerian Artemisia herba-alba essential oils," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 27, no. 5, pp. 437–446, 2015.
- [150] H. Mohsen and F. Ali, "Essential oil composition of Artemisia herba-alba from southern Tunisia.," *Molecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1585–1594, Jan. 2009.
- [151] M. Ghanmi, B. Satrani, a. Aafi, M. R. Isamili, H. Houti, H. Monfalouti, K. H. Benchakroun, M. Aberchane, L. Harki, a. Boukir, a. Chaouch, and Z. Charrouf, "Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (Artemisia herba-alba) de la région de Guerçif (Maroc oriental)," *Phytothérapie*, vol. 8, no. 5, pp. 295–301, Oct. 2010.
- [152] S. Bellili, W. Dhifi, A. Al-Garni, G. Flamini, and W. Mnif, "Essential oil composition and variability of Artemisia herba-alba Asso. growing in Tunisia: comparison and chemometric investigation of different plant organs," *Journal of Applied*

- Pharmaceutical Science*, vol. 6, no. 7, pp. 038–042, 2016.
- [153] N. Dahmani-Hamzaoui and A. Baaliouamer, “Chemical Composition of Algerian *Artemisia herba-alba* Essential Oils Isolated by Microwave and Hydrodistillation,” *Journal of Essential Oil research*, vol. 22, pp. 514–517, 2010.
- [154] E. Dehrwic, Z. Benziane, A. Boukir, N. Resources, S. Mohamed, and B. Abdellah, “Chemical compositions and insecticidal activity of essential oil of three plants *artemisia* sp: *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia pontica* (Morocco),” *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food chemistry*, vol. 8, no. 11, pp. 1202–1211, 2009.
- [155] J. Paolini, E. M. Ouariachi, A. Bouyanzer, B. Hammouti, J.-M. Desjobert, J. Costa, and A. Muselli, “Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from East Morocco,” *Chemical Papers*, vol. 64, no. 5, pp. 550–556, Aug. 2010.
- [156] A. Fleisher, Z. Fleisher, and R. B. Nachbar, “Chemovariation of *Artemisia herba-alba* aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XVI.,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 14, no. 3, pp. 156–160, 2002.
- [157] H. Mighri, H. Hajlaoui, A. Akrouf, H. Najjaa, and M. Neffati, “Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone,” *Comptes Rendus Chimie*, vol. 13, no. 3, pp. 380–386, Mar. 2010.
- [158] V. Aleksic and P. Knezevic, “Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L.,” *Microbiological Research*, 2013.
- [159] G. L. Petretto, M. Maldini, R. Addis, M. Chessa, M. Foddai, J. P. Rourke, and G. Pintore, “Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. *Leucocarpa* DC and var. *Melanocarpa* DC,” *Food Chemistry*, vol. 197, pp. 124–131, 2016.
- [160] W. Aidi Wannes, B. Mhamdi, and B. Marzouk, “Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation,” *Food Chemistry*, vol. 112, no. 3, pp. 621–626, Feb. 2009.
- [161] M. Rahimmalek, M. Mirzakhani, and A. G. Pirbalouti, “Essential oil variation among 21 wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations collected from different

- geographical regions in Iran,” *Industrial Crops and Products*, vol. 51, pp. 328–333, 2013.
- [162] G. Tayoub, A. A. B. U. Alnaser, and I. Ghanem, “Fumigant activity of leaf essential oil from *Myrtus communis* L. against the Khapra Beetle,” vol. 2, no. 1, pp. 207–213, 2012.
- [163] E. H. Ebrahimabadi, S. M. Ghoreishi, S. Masoum, and A. H. Ebrahimabadi, “Combination of GC/FID/Mass spectrometry fingerprints and multivariate calibration techniques for recognition of antimicrobial constituents of *Myrtus communis* L. essential oil,” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1008, pp. 50–57, 2016.
- [164] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, and M. Komaitis, “Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts,” *Food Chemistry*, vol. 107, no. 3, pp. 1120–1130, 2008.
- [165] M. Fadil, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Lebrazi, B. Zghari, and S. Rachiq, “Chemometric investigation of light-shade effects on essential oil yield and morphology of Moroccan *Myrtus communis* L.,” *SpringerPlus*, vol. 5, no. 1, p. 1062, 2016.
- [166] B. Conti, A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, and L. Pistelli, “Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).,” *Parasitology research*, vol. 107, no. 6, pp. 1455–61, Nov. 2010.
- [167] W. Aidi Wannes, B. Mhamdi, J. Sriti, M. Ben Jemia, O. Ouchikh, G. Hamdaoui, M. E. Kchouk, and B. Marzouk, “Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower,” *Food and chemical toxicology*, vol. 48, no. 5, pp. 1362–70, May 2010.
- [168] D. Yadegarinia, L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh, and I. Rasooli, “Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils,” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 12, pp. 1249–55, Jun. 2006.
- [169] V. Aleksic, N. Mimica-Dukic, N. Simin, N. S. Nedeljkovic, and P. Knezevic,

- “Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates,” *Phytomedicine*, vol. 21, no. 12, pp. 1666–1674, 2014.
- [170] J.-C. Chalchat, R.-P. Garry, and a Michet, “Essential oils of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral.,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 10, no. 6, pp. 613–617, 1998.
- [171] M. Akin, A. Aktumsek, and A. Nostro, “Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn . and *Myrtus communis* L . growing in Northern Cyprus,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 4, pp. 531–535, 2010.
- [172] P. Taylor, G. Kofidis, A. Bosabalidis, and S. Kokkini, “Seasonal Variation of Essential Oils in a Linalool-Rich Chemotype of *Mentha spicata* Grown Wild in Greece,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 16, no. April 2013, pp. 469–472, 2004.
- [173] A. H. Al-Marzouqi, M. V. Rao, and B. Jobe, “Comparative Evaluation of SFE and Steam Distillation Methods on the Yield and Composition of Essential Oil Extracted from Spearmint (*Mentha spicata*),” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 30, no. 4, pp. 463–475, 2007.
- [174] M. Znini, M. Bouklah, L. Majidi, S. Kharchouf, A. Aouniti, A. Bouyanzer, B. Hammouti, J. Costa, and S. S. Al-Deyab, “Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid,” *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 6, no. 3, pp. 691–704, 2011.
- [175] R. S. Chauhan, M. K. Kaul, A. K. Shahi, A. Kumar, G. Ram, and A. Tawa, “Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India,” *Industrial Crops and Products*, vol. 29, no. 2–3, pp. 654–656, 2009.
- [176] H. Boukhebti, A. N. Chaker, H. Belhadj, F. Sahli, M. Ramdhani, H. Laouer, and D. Harzallah, “Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils,” *Der Pharmacia Lettre*, vol. 3, no. 4, pp. 267–275, 2011.
- [177] A. I. Hussain, F. Anwar, M. Shahid, M. Ashraf, and R. Przybylski, “Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of

- Spearmint (*Mentha spicata* L.) From Pakistan,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 22, no. 1, pp. 78–84, 2010.
- [178] S. O. S. Hassane, M. Ghanmi, B. Satrani, N. Mansouri, H. Mohamed, H. El Hajaji, and A. Chaouch, “Composition chimique et activités antibactériennes, antifongiques et antioxydante de l’huile essentielle de *Pelargonium asperum* Ehrh. ex Wilde des Comores,” *Acta Botanica Gallica*, vol. 158, no. 2, pp. 225–237, Jan. 2011.
- [179] S. A. Fayed, “Antioxidant and Anticancer Activities of *Citrus reticulata* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) Essential Oils Sayed,” *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, vol. 5, no. 5, pp. 740–747, 2009.
- [180] A. M. Džamić, M. D. Soković, M. S. Ristić, S. M. Grujić, K. S. Mileski, and P. D. Marin, “Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil,” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 4, no. 3, pp. 1–5, 2013.
- [181] I. Atilia and A. Djahoudi, “Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L’Hér.) cultivé en Algérie,” *Phytotherapie*, vol. 13, no. 3, pp. 156–162, 2015.
- [182] B. R. Rajeswara Rao, K. P. Sastry, E. V. S. Prakasa Rao, and S. I. Ramesh, “Variation in Yields and Quality of Geranium (*Pelargonium graveolens* L’ Hér. ex Aiton) under Varied Climatic and Fertility Conditions,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 2, no. 2, pp. 73–79, 1990.
- [183] S. Čavar and M. Maksimović, “Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L’Her,” *Food Control*, vol. 23, no. 1, pp. 263–267, Jan. 2012.
- [184] F. U. Afifi, V. Kasabri, and I. M. Abaza, “Chemical Composition and In vitro Studies of the Essential Oil and Aqueous Extract of *Pelargonium graveolens* Growing in Jordan for Hypoglycaemic and Hypolipidemic Properties,” *European Journal of Medicinal Plants*, vol. 4, no. 2, pp. 220–233, 2014.
- [185] B. R. Rajeswara Rao, “Biomass yield , essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L . f . *piperascens* Malinva . ex Holmes

-),” *Industrial Crops and Products*, vol. 16, pp. 133–144, 2002.
- [186] B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, H. Fougrach, B. Bourkhiss, D. Bousta, and M. Talbi, “Composition chimique et activité antimicrobienne de l’huile essentielle de *Cladanthus mixtus*,” *Bulletin société pharmacologique*, vol. 146, pp. 85–96, 2007.
- [187] S. Zrira, C. Menut, J. M. Bessiere, and B. Benjilalii, “Chemical Composition of the Essential Oils of Moroccan *Ormenis mixta* (L.) Dumort. ssp. *Multicaulis*,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 10, no. 5, pp. 378–385, 2007.
- [188] D. Sharma and H. Vashist, “Hydrodistillation and Comparative Report of Percentage Yield on Leaves and Fruit Peels from Different Citrus Plants of Rutaceae Family,” *Journal of Plant Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 75–78, 2015.
- [189] N. Metoui, S. Gargouri, I. Amri, T. Fezzani, B. Jamoussi, and L. Hamrouni, “Activity antifungal of the essential oils; aqueous and ethanol extracts from *Citrus aurantium* L.,” *Natural product research*, vol. 29, no. 23, pp. 2238–41, 2015.
- [190] J. Družić, I. Jerković, Z. Marijanović, and M. Roje, “Chemical biodiversity of the leaf and flower essential oils of *Citrus aurantium* L. from Dubrovnik area (Croatia) in comparison with *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Washington navel, *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Tarocco and *Citrus si*,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 28, no. 4, pp. 283–291, 2016.
- [191] E. Sarrou, P. Chatzopoulou, K. Dimassi-Theriou, and I. Therios, “Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece,” *Molecules*, vol. 18, no. 9, pp. 10639–10647, 2013.
- [192] F. De Pasquale, M. Siragusa, L. Abbate, N. Tusa, C. De Pasquale, and G. Alonzo, “Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential oils analysis,” *Scientia Horticulturae*, vol. 109, no. 1, pp. 54–59, Jun. 2006.
- [193] G. D. Kiran Babu and B. Singh, “Characteristics Variation of Lavender Oil Produced by Different Hydrodistillation Techniques,” *Comprehensive bioactive natural products: Quality control & standardization*, vol. 8, no. 6, pp. 122–136, 2010.
- [194] K. Hosni, N. Zahed, R. Chrif, I. Abid, W. Medfei, M. Kallel, N. Ben Brahim, and H. Sebei, “Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species:

- Evidence for the genotypic influence,” *Food Chemistry*, vol. 123, no. 4, pp. 1098–1104, Dec. 2010.
- [195] C. A. G. da Camara, Y. Akhtar, M. B. Isman, R. C. Seffrin, and F. S. Born, “Repellent activity of essential oils from two species of Citrus against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse,” *Crop Protection*, vol. 74, pp. 110–115, 2015.
- [196] D. Djenane, “Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*,” *Foods Article*, vol. 4, pp. 208–228, 2015.
- [197] O. Boussaada and R. Chemli, “Seasonal Variation of Essential Oil Composition of Citrus Aurantium L. var. amara,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 10, no. 2, pp. 109–120, 2007.
- [198] V. Rowshan and S. Najafian, “Changes of Peel Essential Oil Composition of Citrus aurantium L. During Fruit Maturation in Iran,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 18, no. 4, pp. 1006–1012, 2015.
- [199] A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia, *Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability*. Bentham e Books, 2010.
- [200] J. Carneiro de Barros, M. Lúcia da Conceição, N. J. Gomes Neto, A. C. Vieira da Costa, J. P. Siqueira, I. D. Basílio, and E. Leite de Souza, “Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 42, no. 6, pp. 1139–1143, 2009.
- [201] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), “Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition,” Pennsylvania 19087 USA, 2012.
- [202] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, pp. 71–79, 2016.
- [203] E. A. Du Toit and M. Rautenbach, “A sensitive standardised micro-gel well diffusion

- assay for the determination of antimicrobial activity,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 42, no. 2, pp. 159–165, 2000.
- [204] L. Nedorostova, P. Kloucek, L. Kokoska, M. Stolcova, and J. Pulkrabek, “Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria,” *Food Control*, vol. 20, no. 2, pp. 157–160, Feb. 2009.
- [205] S. G. D. and K. P. Svoboda, “The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 5, pp. 187–190, 1990.
- [206] S. Inouye, M. Takahashi, and S. Abe, “Inhibitory Activity of Hydrosols , Herbal Teas and Related Essential Oils Against Filament Formation and the Growth of *Candida albicans*,” *journal of medical mycology*, vol. 50, pp. 243–251, 2009.
- [207] A. Ben Hsouna, N. Hamdi, R. Miladi, and S. Abdelkafi, “*Myrtus communis* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens,” *Chemistry and Biodiversity*, vol. 11, no. 4, pp. 571–580, 2014.
- [208] K. Adam, a. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis, “Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oil against human pathogenic fungi,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 97, pp. 1739–1745, 1998.
- [209] B. Imelouane, A. Elbachiri, M. Ankit, H. Benzeid, and K. Khedid, “Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of eastern Moroccan *Lavandula dentata*,” *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 11, no. 2, pp. 113–118, 2009.
- [210] S. Zouari, N. Zouari, N. Fakhfakh, A. Bougatef, and M. A. Ayadi, “Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso,” *Journal Of Medicinal Plants*, vol. 4, no. 10, pp. 871–880, 2010.
- [211] F. Z. Hamdani, R. Allem, M. Meziane, B. Setti, A. S. Ali, and M. Bourai, “Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 12, pp. 1048–1055, 2015.
- [212] K. A. Hammer, C. F. Carson, and T. V. Riley, “Antimicrobial activity of essential oils

- and other plant extracts,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, no. 6, pp. 985–990, 1999.
- [213] D. R. Caccioni, M. Guizzardi, D. M. Biondi, a Renda, and G. Ruberto, “Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *penicillium italicum*,” *International journal of food microbiology*, vol. 43, no. 1–2, pp. 73–9, Aug. 1998.
- [214] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola, and V. De Feo, “Effect of essential oils on pathogenic bacteria,” *Pharmaceuticals*, vol. 6, no. 12, pp. 1451–1474, 2013.
- [215] D. Singh, T. R. S. Kumar, V. K. Gupt, and P. Chaturvedi, “Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations,” *Indian journal of experimental biology*, vol. 50, no. 10, pp. 714–717, Oct. 2012.
- [216] R. C. R. Inder Singh Rana, Aarti Singh Rana, “Evaluation of antifungal activity in essential oil of *syzygium aromaticum* (L) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol,” *Brazilian journal of microbiology*, vol. 42, pp. 1269–1277, 2011.
- [217] L. Jirovetz, G. Eller, G. Buchbauer, E. Schmidt, Z. Denkova, a Stoyanova, R. Nikolova, and M. Geissler, “Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds,” *Recent Res.Dev.Agronomy & Horticult.*, vol. 661, no. 2, pp. 1–12, 2006.
- [218] A. Ultee, M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar, “The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 4, pp. 1561–1568, 2002.
- [219] C. Pina-Vaz, A. Rodrigues, E. Pinto, S. Costa-de-Oliveira, C. Tavares, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, and J. Martinez-de-Oliveira, “Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds,” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, vol. 18, no. 1, pp. 73–78, Jan. 2004.
- [220] K. A. Hammer and C. F. Carson, “Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils,” in *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, 1st ed., vol. 77, no. 12, T.

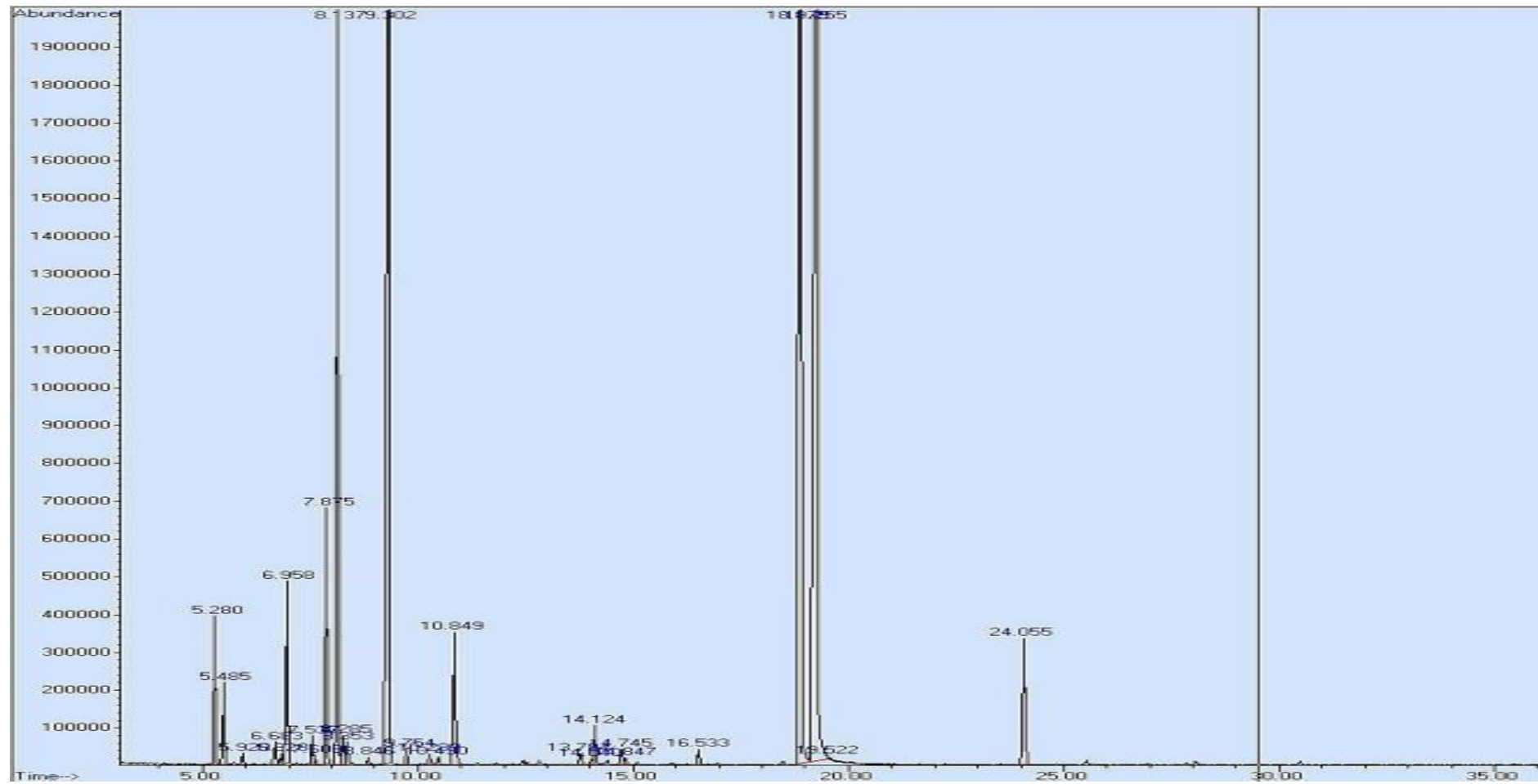
- Halldor, Ed. Chichester, 2011, pp. 256–293.
- [221] J. de L. Marques, L. M. Volc^o, G. D. Funck, I. S. Kroning, W. P. da Silva, ^{ngela} Maria Fiorentini, and G. A. Ribeiro, “Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat,” *Industrial Crops and Products*, vol. 77, pp. 444–450, 2015.
- [222] P. S. X. Yap, B. C. Yiap, H. C. Ping, and S. H. E. Lim, “Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance.,” *The open microbiology journal*, vol. 8, pp. 6–14, 2014.
- [223] E. Chivandi, R. Dangarembizi, T. T. Nyakudya, and K. H. Erlwanger, “Use of Essential Oils as a Preservative of Meat,” in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, V. R. Preedy, Ed. London: Elsevier, 2016, pp. 85–91.
- [224] A. Ultee, A. Slump, G. Steging, and E. J. Smid, “Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice,” *Journal of food protection*, vol. 63, no. 5, pp. 620–624, 2000.
- [225] J. J. Martinez-Irujo, M. L. Villahermosa, E. Alberdi, and E. Santiago, “A checkerboard method to evaluate interactions between drugs,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 51, no. 5, pp. 635–644, 1996.
- [226] S. J. Martin, S. L. Pendland, C. Chen, P. Schreckenberger, and L. H. Danziger, “In vitro synergy testing of macrolide-quinolone combinations against 41 clinical isolates of *Legionella*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 6, pp. 1419–1421, 1996.
- [227] R. Tserennadmid, M. Takó, L. Galgóczy, T. Papp, M. Pesti, C. Vágvölgyi, K. Almássy, and J. Krisch, “Anti yeast activities of some essential oils in growth medium , fruit juices and milk,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, no. 3, pp. 480–486, 2011.
- [228] S. de Rapper, G. Kamatou, A. Viljoen, and S. van Vuuren, “The *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aroma-Therapeutic Oils,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1–10, 2013.

- [229] A. Santiesteban-López, E. Palou, and A. López-Malo, "Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH.," *Journal of applied microbiology*, vol. 102, no. 2, pp. 486–97, Feb. 2007.
- [230] S. D. Cox, C. M. Mann, and J. L. Markham, "Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 492–497, 2001.
- [231] S. F. Van Vuuren and A. M. Viljoen, "Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 22, no. 6, pp. 540–544, Nov. 2007.
- [232] A. Sonboli, F. Eftekhari, and M. Yousefzadi, "Antibacterial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran," *Z Naturforsch*, vol. 60, no. c, pp. 30–34, 2005.
- [233] E. C. R. Maia, D. Borsato, I. Moreira, K. R. Spacino, P. R. P. Rodrigues, and A. L. Gallina, "Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants," *Fuel Processing Technology*, vol. 92, no. 9, pp. 1750–1755, 2011.
- [234] G. Klein, C. Rüben, and M. Upmann, "Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms," *Current Microbiology*, vol. 67, no. 2, pp. 200–208, 2013.
- [235] C. Pina-Vaz, A. Gonçalves Rodrigues, E. Pinto, S. Costa-de-Oliveira, C. Tavares, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, and J. Martinez-de-Oliveira, "Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 18, no. 1, pp. 73–78, 2004.
- [236] R. Avila-Sosa, E. Palou, and A. López-Malo, "Essential Oils Added to Edible Films," in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 1st ed., Victor R. Preedy, Ed. London: Elsevier, 2016, pp. 149–154.
- [237] R. Tserennadmid, M. Takó, L. Galgóczy, T. Papp, C. Vágvölgyi, L. Gerő, and J. Krisch, "Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components," *Central European Journal of Biology*, vol. 5, no. 5, pp. 641–648, Jun. 2010.
- [238] F. Oroojalian, R. Kasra-Kermanshahi, M. Azizi, and M. R. Bassami, "Phytochemical

- composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens,” *Food Chemistry*, vol. 120, no. 3, pp. 765–770, 2010.
- [239] D. R. Johnson and E. a. Decker, “The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review,” *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 6, no. 1, p. 8.1-8.20, 2014.
- [240] R. Kahl and H. Kappus, “Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E,” *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -Forschung*, vol. 196, no. 4, pp. 329–38, Apr. 1993.
- [241] S. Aazza, B. Lyoussi, and M. G. Miguel, “Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds.,” *Molecules*, vol. 16, no. 9, pp. 7672–90, Jan. 2011.
- [242] A. D. Jagdale, S. P. Kamble, M. L. Nalawade, and A. U. Arvindekar, “Citronellol: a potential antioxidant and aldose reductase inhibitor from cymbopogon citratus,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 3, pp. 203–209, 2015.
- [243] M. S. S. Farhath, P. P. Vijaya, and M. Vimal, “An evaluation of toxicity in essential oils of geraniol, geranial acetate, gingerol and eugenol in rats,” *International Journal of Phytomedicine*, vol. 4, no. 4, pp. 519–524, 2012.
- [244] T. Kulisic, A. Radonic, and M. Milos, “Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils,” *Grasas y Aceites*, vol. 56, no. 4, pp. 284–291, 2005.
- [245] B. Prakash, P. Singh, R. Goni, A. K. P. Raina, and N. K. Dubey, “Efficacy of Angelica archangelica essential oil, phenyl ethyl alcohol and α - terpineol against isolated molds from walnut and their antiaflatoxic and antioxidant activity,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 4, pp. 2220–2228, 2015.
- [246] A. Bag and R. R. Chattopadhyay, “Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7, pp. 1–17, 2015.
- [247] O. Yi, D. Han, and H. Shin, “Synergistic Antioxidative Effects of Tocopherol and Ascorbic Acid in Fish Oil / Lecithin / Water System,” *Food Biochemistry Laboratory*,

- Korea Food Research Institute*, vol. 68, pp. 881–883, 1991.
- [248] T. Kurechi and T. Kato, “Studies on the antioxidants. XVI. Synergistic reaction between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in hydrogen donation to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 30, pp. 2964–2970, 1982.
- [249] M. Llana-Ruiz-Cabello, S. Pichardo, S. Maisanaba, M. Puerto, A. I. Prieto, D. Gutiérrez-Praena, A. Jos, and A. M. Cameán, “In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review.,” *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 81, pp. 9–27, 2015.
- [250] N. V. Yanishlieva, E. M. Marinova, M. H. Gordon, and V. G. Raneva, “Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems,” *Food Chemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 59–66, 1999.
- [251] J. Milde, E. F. Elstner, and J. Graßmann, “Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin , γ -terpinene , and ascorbic acid,” pp. 105–113, 2004.
- [252] M. Milos and D. Makota, “Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction,” *Food Chemistry*, vol. 131, no. 1, pp. 296–299, 2012.
- [253] T. Ariga, I. Koshiyama, and D. Fukushima, “Antioxidative Properties of Procyanidins B-1 and B-3 from Azuki Beans in Aqueous Systems¹,” *Ratio*, vol. 52, no. 11, pp. 2717–2722, 1988.
- [254] S. P. J. Namal Senanayake, “Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications - A review,” *Journal of Functional Foods*, vol. 5, no. 4, pp. 1529–1541, 2013.

Annexes

Figure 71: Chromatogramme de l'HE d'*O. compactum*

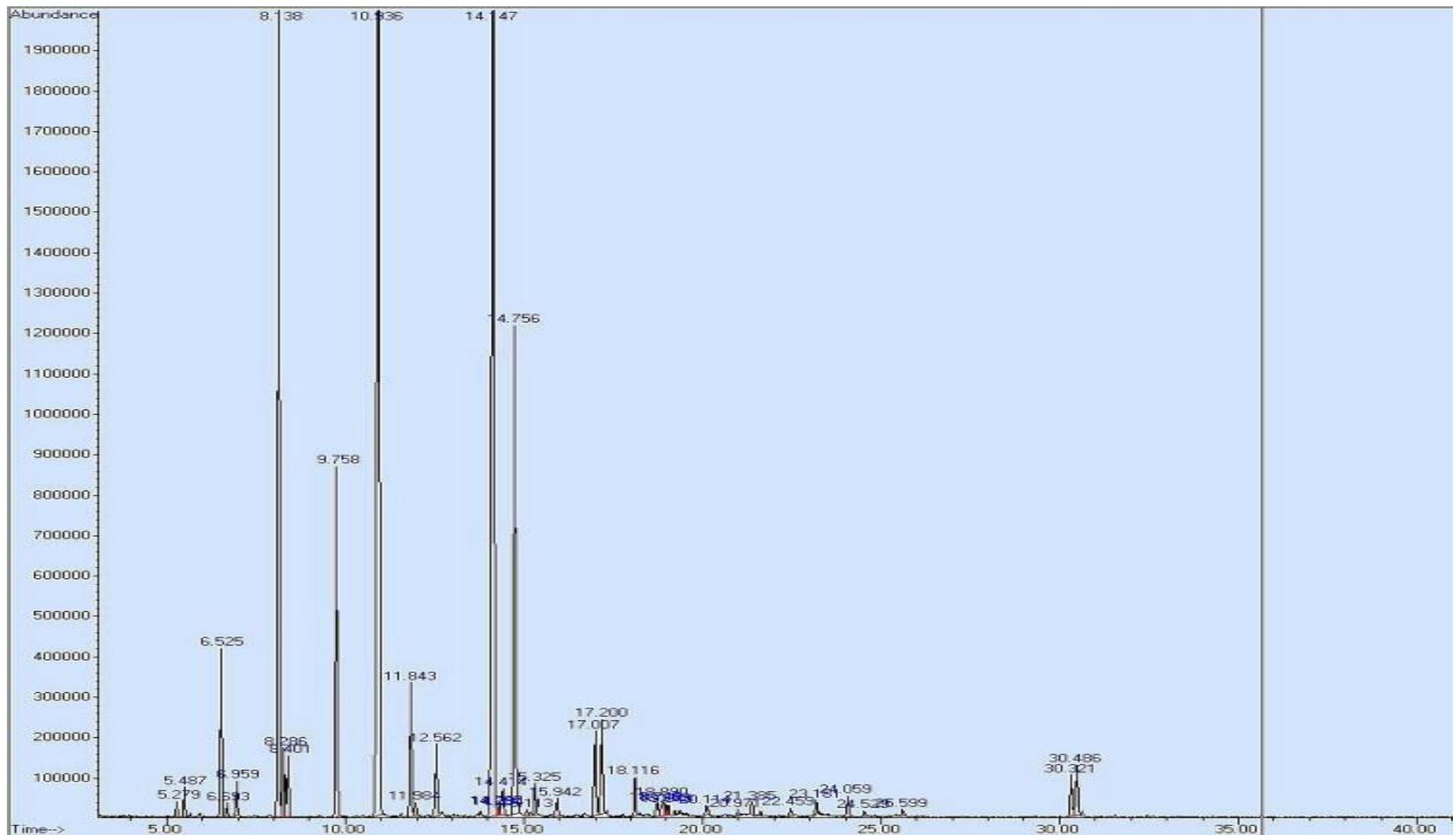


Figure 72: Chromatogramme de l'HE d'*O. majorana*

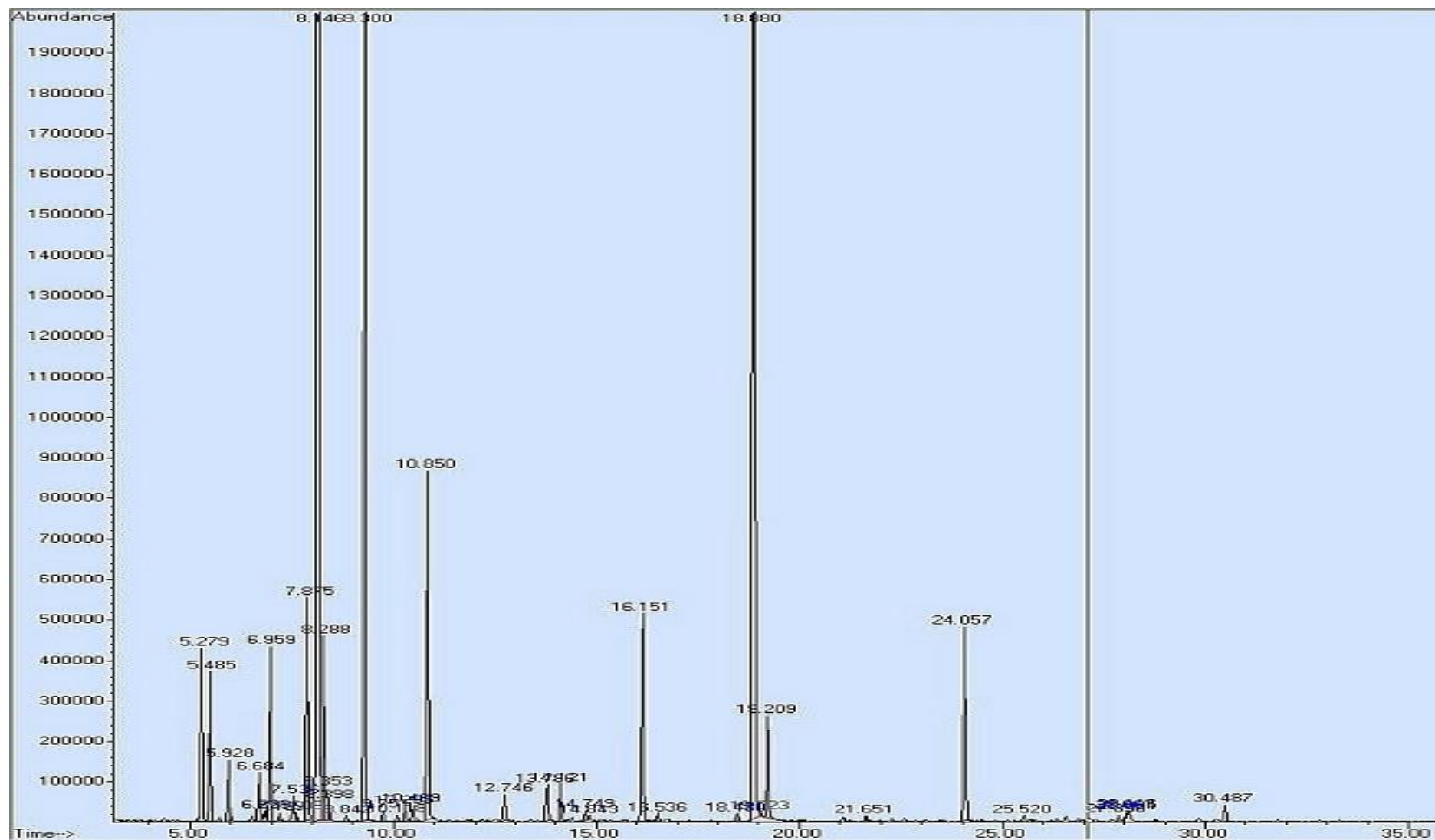


Figure 73: Chromatogramme de l'HE de *T. serpyllum*

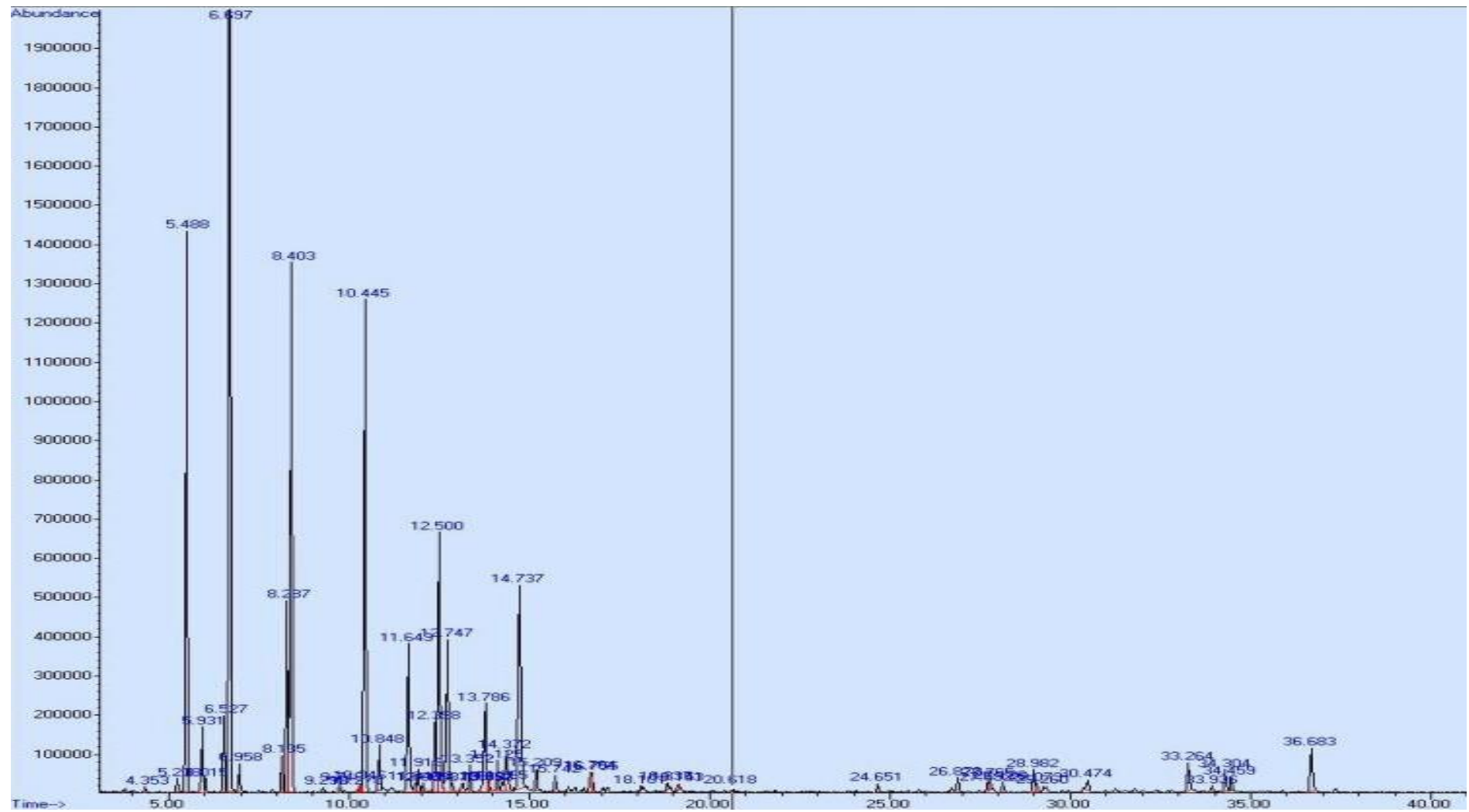


Figure 74: Chromatogramme de l'HE de *L. dentata*

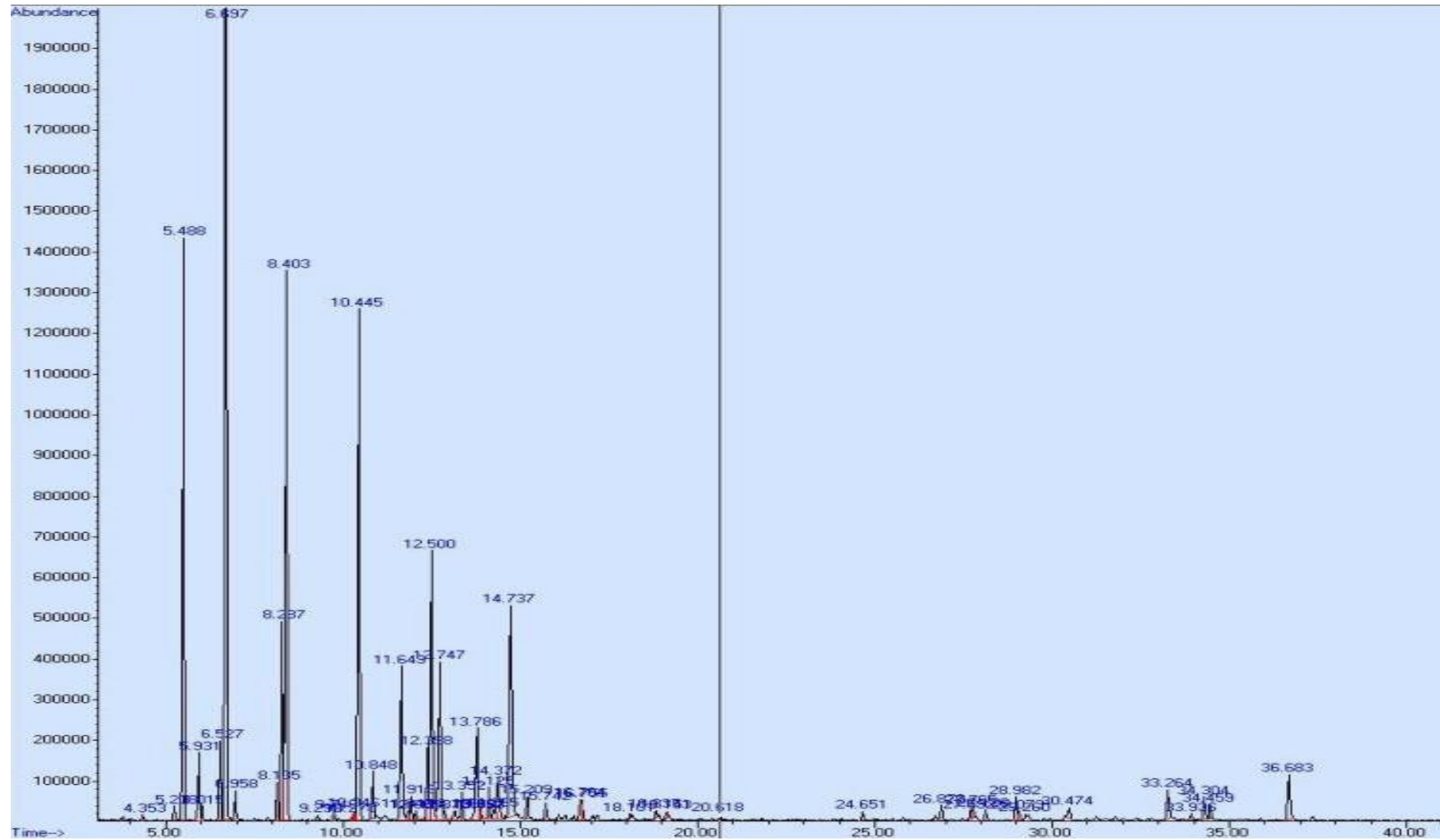


Figure 75: Chromatogramme de l'HE de *M. spicata*

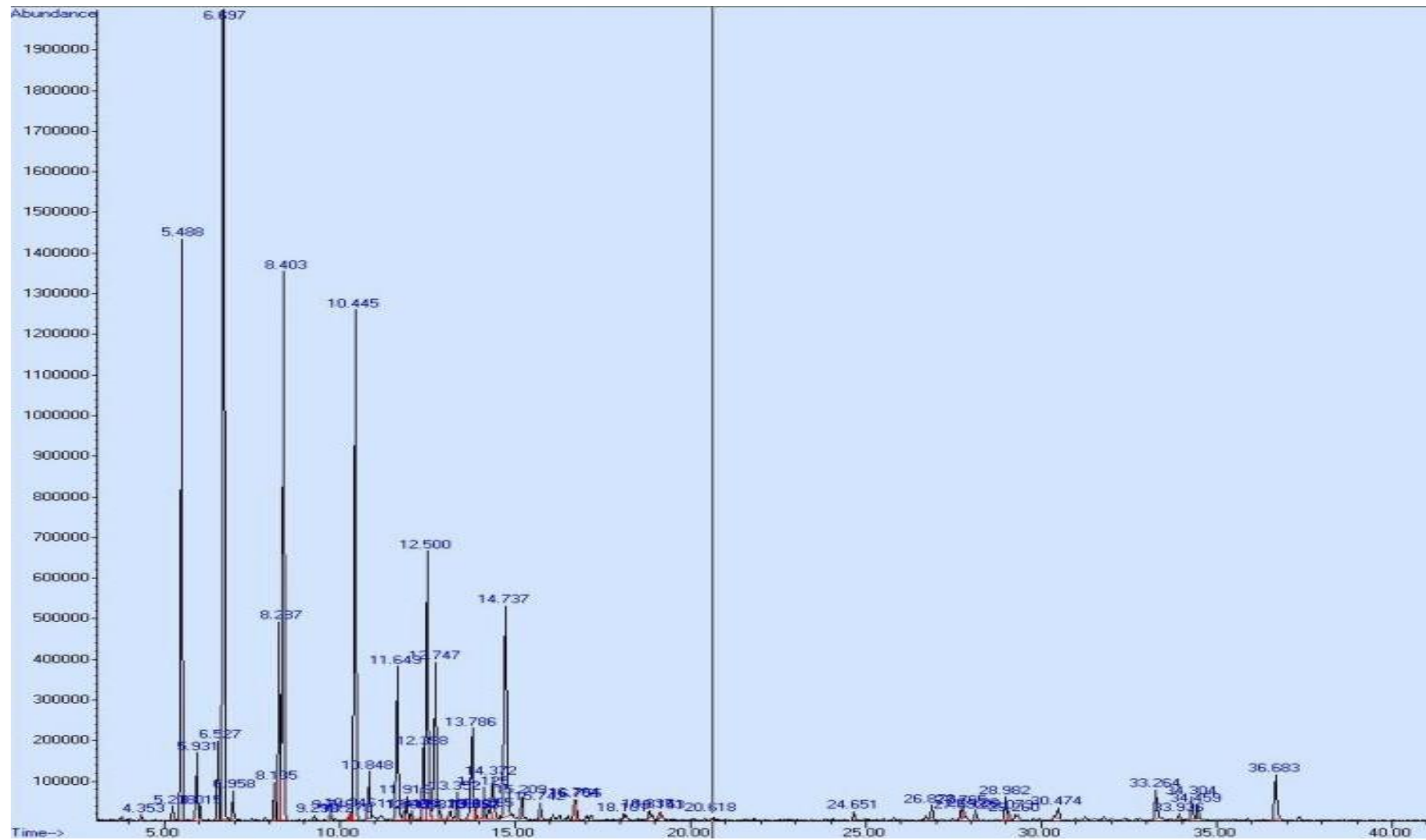


Figure 76: Chromatogramme de l'HE de *M. communis*

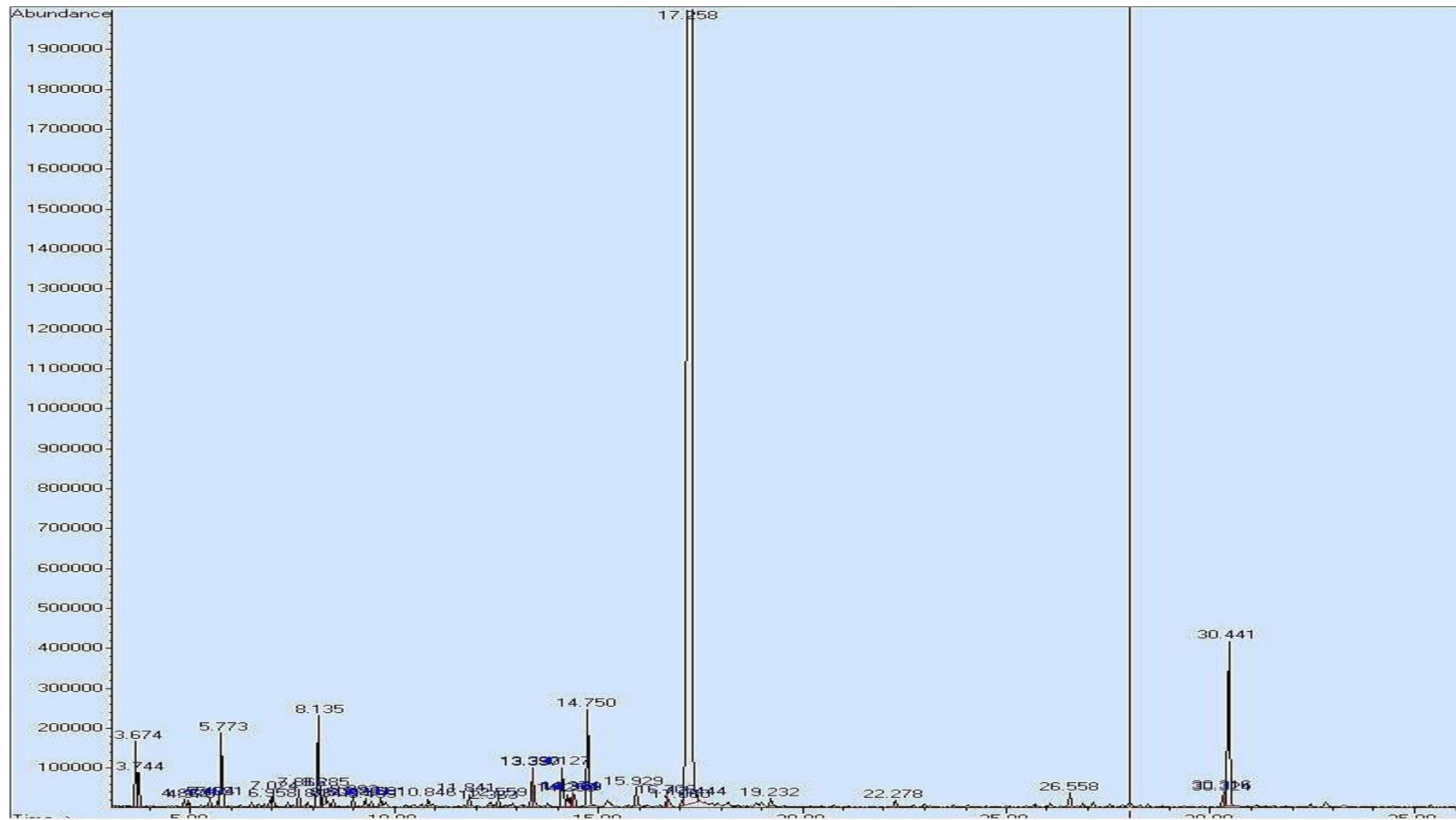


Figure 77: Chromatogramme de l'HE d'*A. herba-alba*

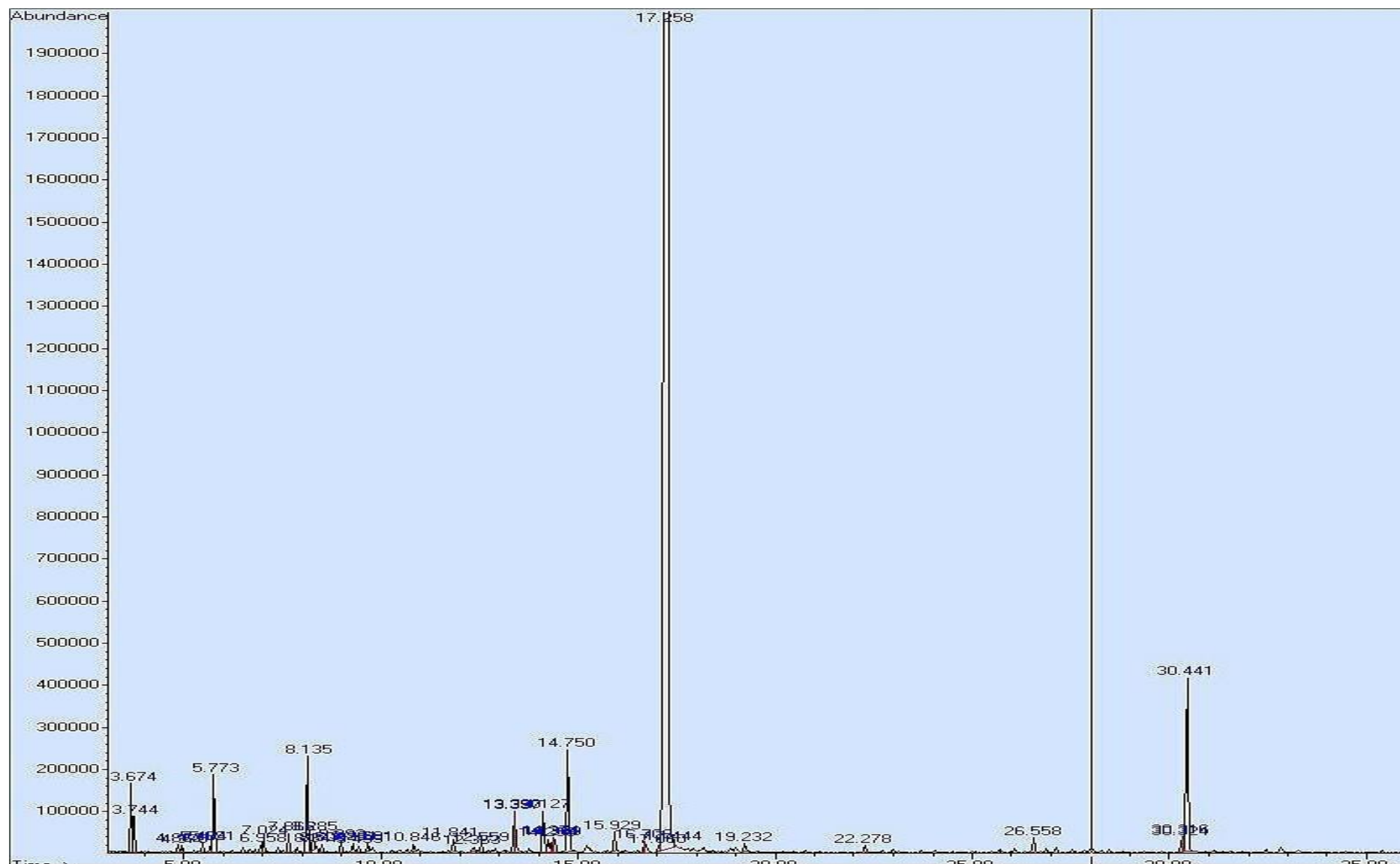


Figure 78: Chromatogramme de l'HE d'O. mixta

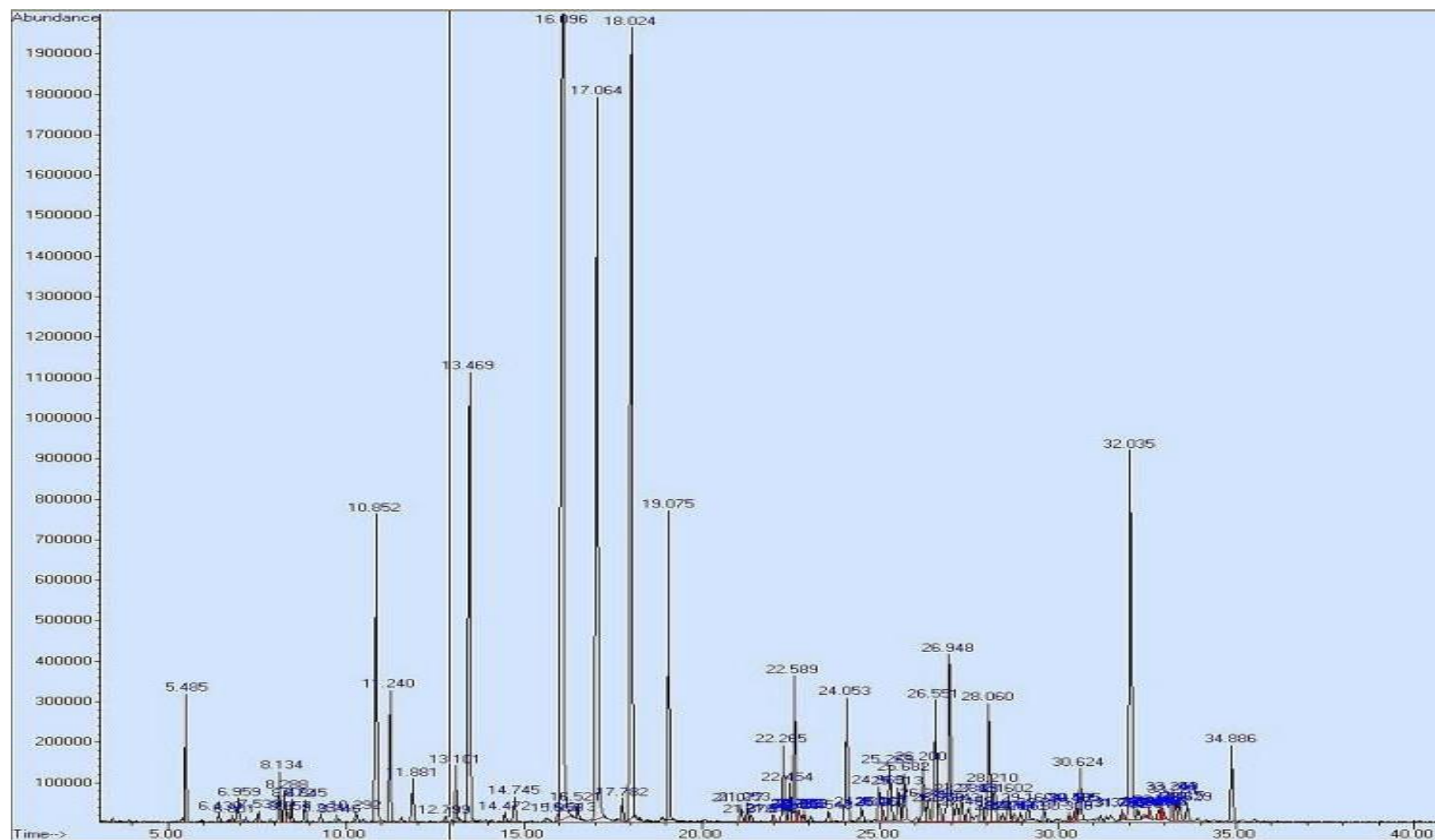


Figure 79: Chromatogramme de l'HE de *P. asperum*



Figure 80: Chromatogramme de l'HE de *C. aurantium* feuilles

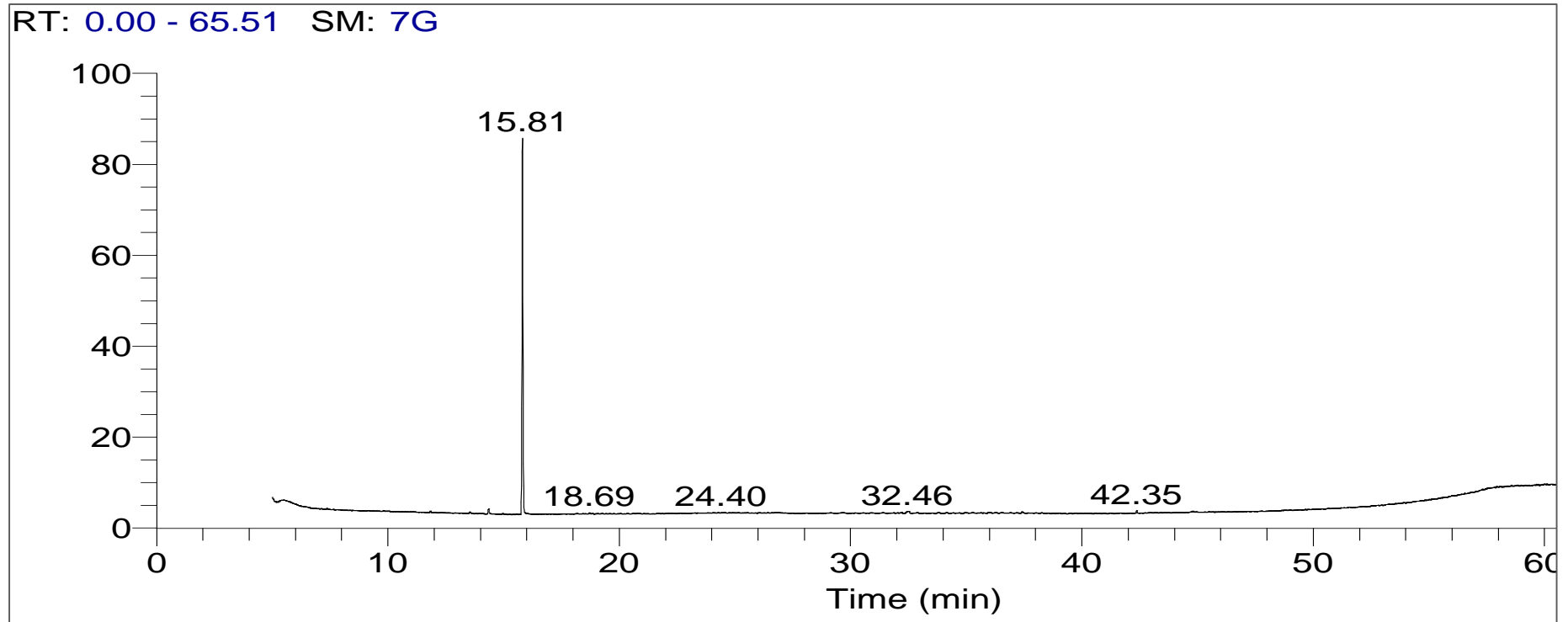


Figure 81: Chromatogramme de l'HE de *C. aurantium* Zest

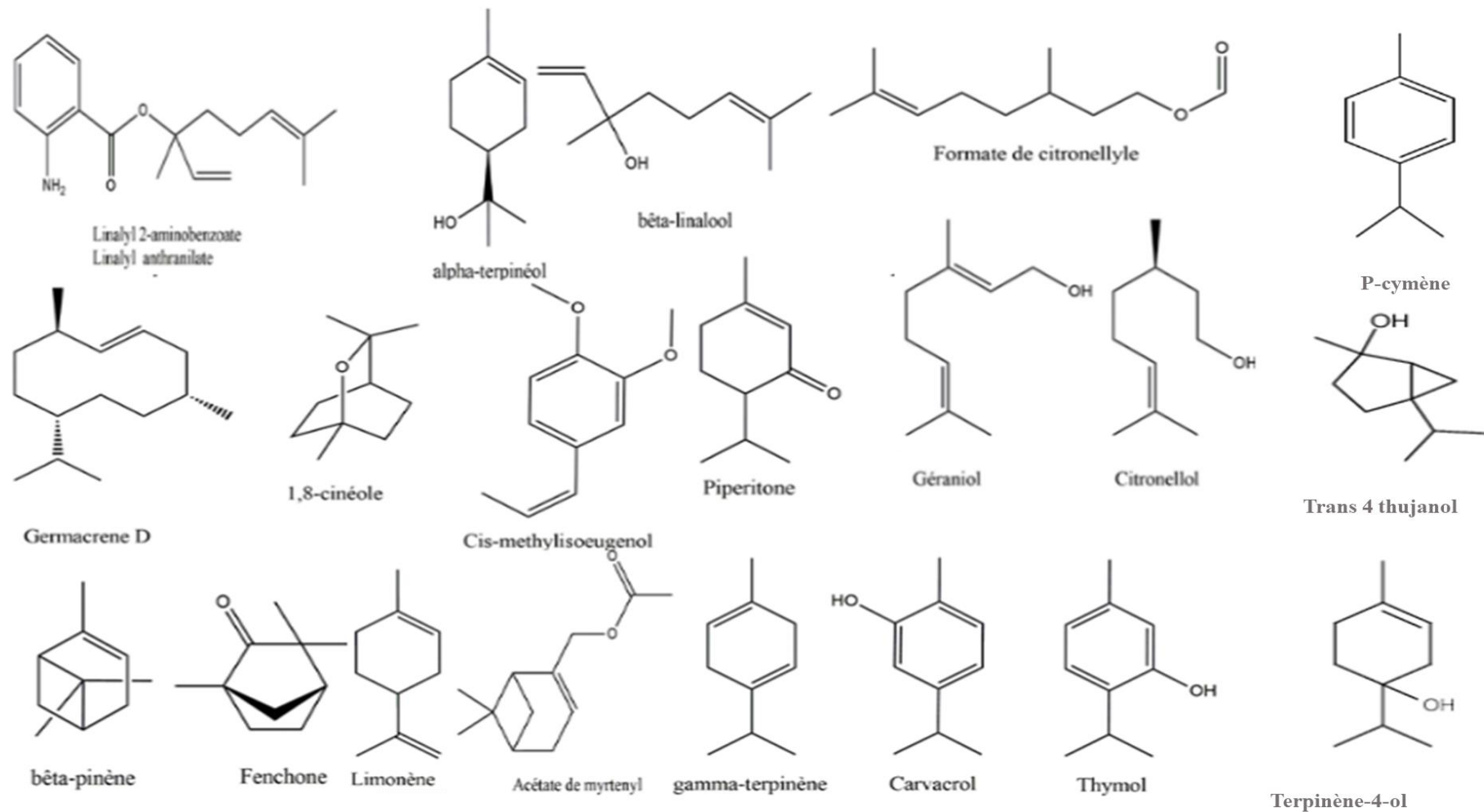


Figure 82: Structures des composés majoritaires des HEs étudiées