جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

N° d'ordre : 44/2024

Centre des Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation Doctorale : Sciences et Génie de la matière, de la Terre et de la Vie
Discipline : Biologie
Spécialité : Biotechnologies et Microbiologie
Laboratoire : Biotechnologie microbienne & molécules bioactives (LBM2B)

Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

Caractérisation chimique et évaluation des activités antimicrobiennes, anti-biofilms et antioxydantes des huiles essentielles d'*Eucalyptus polybractea* R.T. Baker., *Ormenis mixta* (L.) Dumort., *Lavandula burnatii* et de *Lavandula angustifolia* Mill.

Préparée par : Mr. Mohamed JEDDI

Soutenue le 20/07/2024 devant le jury :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	Qualité
Badiaa LYOUSSI	Professeur émérite	Faculté des Sciences, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	Président
Jamal IBIJBIJEN	PES	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteur & examinateur
Hamid MAZOUZ	PES	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteur & examinateur
Youssef KANDRI RODI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Rapporteur & examinateur
Samir ANANOU	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Examinateur
Saad IBNSOUDA KORAICHI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Examinateur
Hanae NACEIRI-MRABTI	MC	ISPITS - Casablanca	Invité
Zineb BENZIANE OUARITINI	MCH	Faculté des Sciences de Fès	Co-encadrante
Kawtar FIKRI BENBRAHIM	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord je commence par remercier Dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il m'a donnée pour accomplir ce travail ; et d'avoir eu la bonté de m'entourer par de personnes formidables qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

J'ai eu l'immense plaisir de réaliser ce travail de recherche dans le laboratoire de Biotechnologie Microbienne & Molécules Bioactives (LBM2B), de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès (FST- Fès), sous la direction du Pr. **Kawtar FIKRI BENBRAHIM**.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Madame la professeure **Kawtar FIKRI BENBRAHIM**, ma directrice de thèse, qui a bien orienté ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. J'ai profité pendant longtemps du savoir et du savoir-faire dont j'ai pu bénéficier au cours de nombreuses discussions. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité et à la totale confiance qu'elle m'a accordée. Sa grande expérience, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en elle une directrice ouverte qui m'a guidé dans mon travail tout au long de ces années. Je la remercie infiniment de s'être souciée de mon devenir. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance dont elle a fait preuve à mon égard. Je vous serai éternellement reconnaissant.

Madame la Professeure **Zineb BENZIANE OUARITINI**, Co-Directrice de thèse et Professeure à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès. Je vous témoigne ma vive reconnaissance de m'avoir accueilli dans votre équipe. Vous m'avez permis de mener à bien mon travail grâce à vos conseils judicieux, votre dynamisme et votre disponibilité pour répondre à mes questionnements. Je vous suis par ailleurs très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée. Permettez-moi de vous exprimer ma profonde gratitude et ma plus haute estime.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs **Saad IBNSOUDA KORAICHI et Rachid BENCHEIKH** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne & Molécules Bioactives (LBM2B) de la FST-Fès, pour m'avoir fait confiance, m'avoir conseillé et m'avoir encouragé tout en me laissant une grande liberté. Je leurs exprime aussi ma sincère gratitude.

Je suis très honoré par la présence de Madame **Badiaa Lyoussi**, Professeure Emérite à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès. En exprimant ma sincère gratitude, soyez remercié pour votre présence et votre présidence de ce jury.

Je remercie Monsieur **Jamal IBIJBIJEN**, Professeur à la Faculté des Sciences, Meknès, pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement sera valorisant dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.

Monsieur le Professeur **Hamid MAZOUZ**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès, un grand merci pour avoir bien voulu participer à ce jury et d'être le rapporteur de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de vos observations judicieuses et je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

J'exprime ma reconnaissance également au Professeur à **Youssef KANDRI RODI**, Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui me fait l'honneur d'examiner ce travail en qualité de rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements et ma très sincère considération.

Merci Professeur **Samir ANANOU**, de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour l'intérêt manifesté à l'égard de ce travail en acceptant d'être examinateur. Avec ma profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Mes vifs remerciements s'adressent au Pr. **Saad IBNSOUDA KORAICHI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour son soutien, ses encouragements et ses conseils permanents. Je le remercie également pour sa disponibilité quotidienne et pour avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail. Qu'il trouve ici ma vive reconnaissance et tout mon respect.

Un grand remerciement est adressé au **Pr. Mouhcine FADIL**, du laboratoire de Chimie Organique, FST Fès, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa grande contribution.

J'exprime toute ma reconnaissance particulière au Pr. **Hanae NACEIRI MRABTI**, Professeure à l'Institut Supérieur des Professions infirmières et Techniques de Santé (ISPITS), Casablanca, pour son aide, son soutien et ses orientations constructives tout au long de ce parcours de recherche. Je la remercie pour son amitié et son temps investi, ses moyens et son savoir-faire pour que ce travail puisse être de cette qualité.

Je remercie vivement, Docteur **Naoufal EL HACHLAFI**, pour son amitié, son assistance, sa confiance et ses conseils précieux tout le long de mon travail de thèse.

Je profite d'occasion pour adresser un immense merci à tous les membres du LBM2B, plus particulièrement **Pr. Khadija BEKHTI**, **Pr. Mohammed IRAQUI HOUSSAINI**, **Pr. Naima EL GHACHTOULI**, **Pr. Laila MANNI**, **Pr. Lotfi AARAB** et **Pr. Rachid BENCHEIKH**, qui par leur gentillesse et leur disponibilité, ont rendu le quotidien de ces années de thèse agréable et chaleureux.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues et amis de travail qui m'ont soutenu par leur amitié au fil des années. Je suis reconnaissant pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée et les merveilleux moments partagés, en particulier mes amis : Mr. **Naoufal EL HACHLAFI**, Mme **Nesrine BENKHAIRA** sans oublier ***Amine BATBAT***, ***Mohamed FERIOUN***, ***Samir JEDDI***, ***Charif MERDAZ***, ***Youssef MAHOU, Badr ERRABITI***, ***Nouhaila ZOUINE***, ***Ilham ZOUITANE***, ***Safae ER RAOUAN***, ***Chaymae HMIMEN***, ***Samira JAOUHAR***, ***Soukaina LAARAJ***, ***Marwa CHRAIBI, Rachid FLOUCHI***, ***Ibrahim TOUZANI*** et ***Marouane SALHI***.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans la précieuse collaboration de toutes ces personnes.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie **ALLAH**, tout puissant, de m'avoir donné l'énergie de surmonter les obstacles et le courage de dépasser toutes les difficultés.

Je remercie Dieu pour ce que je suis et ce que j'ai.

A mes très chers parents Mohamed JEDDI et Fatima MHIHAD

Aucune dédicace ne pourrait refléter pleinement l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que je vous porte depuis toujours. Que Dieu tout-puissant vous bénisse et vous accorde santé et bonheur.

À Mes frères **Hafid, Samir & Jad;** A ma Soeur **Rajaa.**

Aucun mot ne saurait exprimer mon profond respect et ma gratitude sincère et constante. Je vous dédie ce travail en priant Dieu tout-puissant de vous accorder une vie longue, remplie de bonheur, de prospérité et de réussite ;
En vous souhaitant l'avenir brillant que vous méritez.

A mes amis **Naoufal El Hachlafi, Amine Batbat, Nesrine Benkhaira, Mohamed Ferioun, Youssef Mahou.**

Pour leurs qualités humaines, leur soutien et leur générosité.

J'ai partagé de très beaux moments avec vous, merci.

Résumé de la thèse

Ce travail vise à contribuer à la valorisation des huiles essentielles (HEs) issues de quatre plantes médicinales et aromatiques, à savoir *Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta*, *Lavandula burnatii* et *Lavandula angustifolia.* Ceci sera réalisé en analysant leur composition chimique et en évaluant leurs propriétés antimicrobiennes, anti-biofilms et antioxydantes. Ainsi qu'en mettant en évidence l'effet combiné des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii* et *O. mixta* en tant qu'agents antimicrobiens et antioxydants. Puis en développant des combinaisons optimales contre la formation de biofilms d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* sur des surfaces en résine acrylique, à l'aide d'un plan d'expérience.

L'analyse de la composition chimique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), des quatre HEs extraites par hydrodistillation, a permis de détecter 72 composés au total. En effet, 25, 28, 33 et 30 composants bioactifs ont été identifiés dans les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia*, respectivement. Les principaux constituants étaient le 1,8-cinéole (23,75%) et le p-cymène (22,74%) dans l'huile d'*E. polybractea* ; le *p*-menthane-1,8-diol (18,19%) et de l'α-pinène (10,81%) dans l'HE d'*O. mixta.* Tandis que le linalol et l'acétate de linalyle sont les principaux composés des HEs des deux espèces de Lavandula, avec des pourcentages respectifs de 24,40% et 18,68 % pour l'HE de *L. burnatii* et de 28,94 % et 19,95 % pour l'HE de *L. angustifolia*.

L'étude de l'activité antimicrobienne des quatre HEs en utilisant les méthodes de diffusion par disque ainsi que de microdilution (CMI, CMB) a révélé que les HEs testées exercent un pouvoir bactéricide et fongicide contre les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif et *Candida albicans*. En effet, une sensibilité Gram-dépendant a été aussi remarquée. Les valeurs de la CMI, de la CMB et de la CMF variaient entre 0,125 et 32% (v/v). Les rapports CMF/CMI et CMB/CMI étaient généralement de 4,0 % (v/v) ou moins, ce qui témoigne d'effets candidicides et bactéricides importants. En outre, l'activité antimicrobienne des mélanges binaires, mise en évidence par le calcul de l'ICIF contre *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*, a montré des résultats antimicrobiens synergiques, indifférents ou additifs. De plus, l'effet antimicrobien combiné a été confirmé en utilisant le plan de mélange. L'optimisation de l'activité antimicrobienne des combinaisons a montré l'effet synergique entre les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii.* La combinaison optimale prédite vis-à-vis d'*E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* correspondait à 32%/28%/40%, 35%/30%/35%, 61%/39%/0%, des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, respectivement. L'investigation de l'angle de contact a montré que les huiles d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, ainsi que leurs formulations optimales, empêchent la formation de biofilms d'*E. coli* et de *S. aureus* en modifiant les propriétés physico-chimiques de la surface de la résine acrylique. Ces découvertes sont confirmées par l'analyse au microscope électronique à balayage (MEB), démontrant que les combinaisons des huiles sont capables d'empêcher l'adhésion des cellules bactériennes à la surface de la résine acrylique.

Par ailleurs, l'activité antioxydante des HEs pures d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia* a été évaluée en utilisant deux méthodes complémentaires, à savoir les tests DPPH et pouvoir réducteur. Les résultats ont révélé que les HEs testées présentent des activités antioxydantes, avec des degrés variables de pouvoir réducteur du fer et d'activité antiradicalaire (DPPH). Enfin, l'effet antioxydant combiné des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* a été étudié à l'aide d'un plan de mélange. L'optimisation de l'activité antioxydante des combinaisons a montré l'effet synergique entre les trois huiles. La combinaison optimale prédite pour les tests DPPH et le pouvoir réducteur correspondait à 53%/29%/18% et 46%/34%/20%, des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, respectivement.

Cette étude montre que les quatre plantes examinées ont des activités biologiques intéressantes, confirmant leur utilisation ethnobotanique et offrant des usages possibles en tant que médicaments.

Mots-clés : *E. polybractea* ; *O. mixta* ; *L. burnatii* ; *L. angustifolia* ; Résistance antimicrobienne ; Huiles essentielles ; Stress oxydatif ; Plan de mélange ; biofilm.

Abstract

This work aims to contribute to the valorization of essential oils (EOs) derived from four medicinal and aromatic plants, namely *Eucalyptus polybractea, Ormenis mixta, Lavandula burnatii* and *Lavandula angustifolia*. This will be achieved by analyzing their chemical composition and evaluating their antimicrobial, anti-biofilm and antioxidant properties. Furthermore, the combined effect of *E. polybractea*, *L. burnatii* and *O. mixta* EOs as antimicrobial and antioxidant agents will be demonstrated. As well as developing optimal combinations against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilm formation on acrylic resin surfaces, using an experimental design.

Analysis of the chemical composition of the four EOs extracted by hydrodistillation, using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), revealed a total of 72 compounds. Twenty-five, twenty-eight, thirty-three and thirty bioactive components were identified in the oils of *E. polybractea, O. mixta, L. burnatii* and *L. angustifolia*, respectively. The main constituents were 1,8-cineole (23.75%) and p-cymene (22.74%) in *E. polybractea* oil; p-menthane-1,8-diol (18.19%) and α-pinene (10.81%) in *O. mixta* EO. Whereas linalool and linalyl acetate are the main compounds in the EOs of both Lavandula species, with respective percentages of 24.40% and 18.68% for *L. burnatii* EO and 28.94% and 19.95% for *L. angustifolia* EO.

Investigation of the antimicrobial activity of the four EOs using disc diffusion and microdilution methods (MIC, MBC) revealed that the EOs tested were bactericidal and fungicidal against Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria and Candida albicans. Gram-dependent sensitivity was also observed. MIC, MBC and MFC values ranged from 0.125 to 32% (v/v). CMF/CMI and CMB/CMI ratios were generally 4.0% (v/v) or less, indicating significant candidicidal and bactericidal effects. Furthermore, the antimicrobial activity of the binary mixtures, evidenced by the calculation of FICI against *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*, showed synergistic, indifferent or additive antimicrobial results. In addition, the combined antimicrobial effect was confirmed using the mixture design. Optimization of the antimicrobial activity of the combinations showed a synergistic effect between the EOs of *E. polybractea, O. mixta* and *L. burnatii*. The predicted optimal combination against *E. coli, S. aureus* and *C. albicans* corresponded to 32%/28%/40%, 35%/30%/35%, 61%/39%/0%, of the EOs of *E. polybractea, O. mixta* and *L. burnatii*, respectively. Investigation of the contact angle showed that *E. polybractea, O. mixta* and *L. burnatii* oils, together with their optimal formulations, prevent the formation of *E. coli* and *S. aureus* biofilms by modifying the physico-chemical properties of the acrylic resin surface. These findings are confirmed by scanning electron microscope (SEM) analysis, demonstrating that the oil combinations are capable of preventing bacterial cell adhesion to the acrylic resin surface.

In addition, the antioxidant activity of pure EOs of *E. polybractea, O. mixta, L. burnatii* and *L. angustifolia* was assessed using two complementary methods, namely the DPPH and reducing power tests. The results revealed that the EOs tested showed antioxidant activity, with varying degrees of iron reducing power and free radical scavenging activity (DPPH). Finally, the combined antioxidant effect of *E. polybractea, O. mixta* and *L. burnatii* EOs was studied using a mixing design. Optimization of the antioxidant activity of the combinations showed the synergistic effect between the three oils. The optimal combination predicted for DPPH tests and reducing power corresponded to 53%/29%/18% and 46%/34%/20%, of *E. polybractea, O. mixta* and *L. burnatii* EOs, respectively.

This study shows that the four examined plants have interesting biological activities, confirming their ethnobotanical use and offering possible applications as natural drugs.

Keywords: *E. polybractea* ; *O. mixta* ; *L. burnatii* ; *L. angustifolia* ; Antimicrobial resistance; Essential oils; Oxidative stress; Mixing design; Biofilm.

ملخص

تهدف هذه الأطروحة إلى المساهمة في تقييم الزيوت الأساسية المستخرجة من أربعة نباتات طبية وعطرية وهي *إوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا*، *لافاندولا بيرناتي* و*لافاندولا أنغستيفوليا*. سيتم ذلك من خلال تحليل تركيبها الكيميائي وتقييم خصائصها المضادة للميكروبات و الأكسدة ، و مقاومة الطبقات الجرثومية. كما يهدف هذا العمل إلى إظهار التأثير المجتمع للزيوت الأساسية*لإوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *لافاندولا بيرناتي* و*أورمنيس ميكستا* كوكلاء مضادة للميكروبات ومضادة للأكسدة. وأيضًا تطوير تركيبات مثلى ضد تكون الأغشية الحيوية*للإشيريشيا كولاي* و البكتيريا الكروية العنقودية الذهبية على الأسطح الأكريليكية بمساعدة خطة الخلط.

سمح تحليل التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية الأربعة باستخدام تقنية الإستشراب الغازي - مطيافية الكتلة بالكشف عن 72 مركبًا بشكل إجمالي. في الواقع، تم تحديد 25، 28، 33 و 30 مكونًا نشطًا بيولوجيًا في زيوت *إوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا*، *لافاندولا بيرناتي* و*لافاندولا أنغستيفوليا* على التوالي. وكانت المكونات الرئيسية هي 1,8-سينيول (23,75%) والباراسيمين (22,74%) في زيت *إوكاليبتوس بوليبراكتيا*. والمنثان-1,8-ديول (18,19%) والألفا-بينين (10,81%) في زيت *أورمنيس ميكستا*. في حين أن الليناليول وخلات الليناليل هما المركبات الرئيسية في زيوت *لافاندولا*، بنسب تبلغ 24,40% و 18,68% على التوالي لزيت *لافاندولا بيرناتي* و 28,94% و 19,95% لزيت *لافاندولا أنغستيفوليا*.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للميكروبات أن الزيوت الأساسية المختبرة تمارس قوة قتل للبكتيريا والفطريات. كانت قيم CMI، CMB، و CMF تتراوح بين 0,125 و 32 % (v/v). كانت نسب CMF/CMI و CMB/CMI تساوي عمومًا 4,0% (v/v) أو أقل، مما يدل على وجود آثار كبيرة للقتل للكانديدا والبكتيريا. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت النتائج الفعالية المضادة للميكروبات للخلائط الثنائية، التي تم توضيحها من خلال حساب القيمة ICIF للتفاعل مع *E. coli*، *S. aureus* و *C. albicans*، نتائج مضادة للميكروبات تؤثر بشكل متآزر أو محايد أو مضاف. علاوة على ذلك، تم تأكيد التأثير المضاد للميكروبات المشترك باستخدام خطة الخلط. أظهرت تجربة خطة الخلط تأثيرًا تآزريًا بين الزيوت الأساسية *إيوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا* و*لافاندولا بيرناتي*.

كانت التركيبة المثلى المتوقعة تجاه *E. coli*، *S. aureus* و *C. albicans* تمثل 32%/28%/40%، 35%/30%/35%، 61%/39%/0%، من زيوت *إيوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا* و*لافاندولا بيرناتي* على التوالي. كشف تحقيق زاوية الاتصال أن زيوت *إيوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا* و*لافاندولا بيرناتي*، وتركيباتها المثلى، تمنع تكون الأغشية الحيوية ل*لإشيريشيا كولاي* والعنقوديات الذهبية من خلال تغيير الخصائص الفيزيائية والكيميائية لسطح الراتنج الأكريليكي. وتؤكد هذه الاكتشافات من خلال التحليل بالمجهر الإلكتروني الماسح، أن تركيبات الزيوت قادرة على منع الخلايا البكتيرية من الالتصاق بسطح الراتنج الأكريليكي.

علاوة على ذلك، أظهرت النتائج أن الزيوت الأساسية المختبرة تظهر أنشطة مضادة للأكسدة، مع درجات متفاوتة من قدرة الاختزال للحديد ونشاط مكافحة الشوارد الحرة. وأخيرًا، تم دراسة التأثير المضاد للأكسدة المشترك للزيوت الطيارة *لإيوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا* و*لافاندولا بيرناتي* باستخدام خطة الخلط. أظهر تحسين النشاط المضاد للأكسدة للتركيبات تأثيرًا تآزريًا بين الزيوت الثلاثة. وكانت التركيبة المثلى المتوقعة ضد الشوارد الحرة وقدرة الاختزال تمثل 53%/29%/18% و 46%/34%/20%، من زيوت *إيوكاليبتوس بوليبراكتيا*، *أورمنيس ميكستا* و*لافاندولا بيرناتي* على التوالي.

أظهرت هذه الأطروحة أن النباتات الأربعة المدروسة تحتوي على أنشطة بيولوجية مثيرة للاهتمام، مما يؤكد استخدامها في العلاج النباتي التقليدي ويقدم استخدامات محتملة كأدوية.

الكلمات المفتاحية: *أوكاليبتوس بوليبراكتيا*؛ *أورمنيس ميكستا*؛ *لافاندولا بيرناتي*؛ *لافاندولا أنغستيفوليا* ؛ مقاومة مضادات الميكروبات؛ زيوت أساسية ؛ الاكسدة؛ خطة الخلط ؛ الطبقات الجرثومية.

Liste des Publications

- **Jeddi, M.**, El Hachlafi, N., El Fadili, M., Benkhaira, N., Al-Mijalli, S.H., Kandsi, F., Abdallah, E.M., Ouaritini, Z.B., Bouyahya, A., Lee, L.-H., Zengin, G., Mrabti, H.N., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Antimicrobial, antioxidant, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of a chemically characterized essential oil from *Lavandula angustifolia* Mill.: *in vitro* and in silico investigations. ***Biochemical Systematics and Ecology*** 111, 104731.
- **Jeddi, M.**, El Hachlafi, N., Fadil, M., Benkhaira, N., Jeddi, S., Benziane Ouaritini, Z., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Combination of Chemically-Characterized Essential Oils from *Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta*, and *Lavandula burnatii*: Optimization of a New Complete Antibacterial Formulation Using Simplex-Centroid Mixture Design. ***Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*** 2023.
- **Jeddi, M.**, Benziane Ouaritini, Z., Shita, R., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Focus on the ethnobotany of north Moroccan sage, false yellowhead, and carrot: insights into their pharmacological potential. ***Journal of Herbmed Pharmacology*** 12(4), 536–548.
- **Jeddi, M.**, Fikri-Benbrahim, K., El Hachlafi, N., Benkhaira, N., Aboussemdai, A., Ouaritini, Z.B., **2023**. Chemical Composition of *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum* and *Vetiveria zizanoides* Essential oils and their Antibacterial and Antioxidant Activities. ***Tropical Journal of Natural Product Research*** 7(1), 2244-2250.
- **Jeddi, M.**, Ouaritini, Z.B., Fikri-Benbrahim, K., **2021**. Ethnobotanical study of medicinal plants in northern Morocco (Taounate): case of Mernissa. ***Ethnobotany Research and Applications*** 21, 1–23.
- Jeddi, S., Ferioun, M., Benkhaira, N., **Jeddi, M.**, El Hachlafi, N., Fikri-Benbrahim, K., **2024**. Ethnobotanical appraisal of indigenous medicinal plants used in the Taounate region (Northern Morocco): Qualitative and quantitative approaches. ***Ethnobotany Research and Application***s 28, 1-26.
- Benkhaira, N., El Hachlafi, N., El fadili, M., **Jeddi, M.**, Abdnim, R., Bnouham, M., Koraichi, S.I., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Unveiling the phytochemical profile, *in vitro* bioactivities evaluation, in silico molecular docking and ADMET study of essential oil from *Clinopodium nepeta* grown in Middle Atlas of Morocco. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*** 54, 102923.
- El Hachlafi, N., Benkhaira, N., Zouine, N., Fadil, M., **Jeddi, M.**, Jeddi, S., Flouchi, R., Koraichi, S.I., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Exploration of novel antibacterial and anti-adhesive formulations from three chemically characterized essential oils: optimization using experimental design methodology. ***Scientific African*** 22, e01927.
- El Hachlafi, N., Mrabti, H.N., Al-Mijalli, S.H., **Jeddi, M**., Abdallah, E.M., Benkhaira, N., Hadni, H., Assaggaf, H., Qasem, A., Goh, K.W., Al-Farga, A., Bouyahya, A., Fikri-Benbrahim, K., **2023**. Antioxidant, volatile compounds; antimicrobial, anti-inflammatory, and dermatoprotective properties of *cedrus atlantica* (endl.) manetti ex carriere essential oil: *in vitro* and in silico investigations. **Molecules** 28(15), 5913.

Sommaire

Introduction générale 1
Partie I : Revue Bibliographique 6
I. Généralités sur les plantes médicinales 7
1. Historique 7
2. Plantes médicinales au Maroc 9
II. Généralités sur les huiles essentielles 9
1. Définition 9
2. Composition chimique des HEs 10
2.1 Terpènes 10
2.2 Monoterpènes 11
2.3 Sesquiterpènes 11
2.4 Composés aromatiques 11
3. Extraction des huiles essentielles 11
4. Facteurs influençant la composition chimique des HEs 12
III. Pouvoir antimicrobien des HEs 13
1. Résistance aux antimicrobiens 13
2. Formation du biofilm 14
3. Composants de la matrice du biofilm 15
4. Etapes de formation du biofilm 15
5. Mécanismes d'action des huiles essentielles 16
IV. Effet antioxidant des huiles essentielles 19
1. Stress oxidatif 19
2. Rôle de la défense antioxydante dans les organismes 20
3. Activité anti-oxydante des huiles essentielles 21
V. Présentation des espèces étudiées 23
1. Description de la famille des Lamiacées 23
1.1 *Lavandula angustifolia* Mill 24
1.1.1 Taxonomie et description botanique 24
1.1.2 Répartition géographique 25
1.2 *Lavandula burnatii* ou *Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loisel 25
1.2.1 Taxonomie et description botanique 25
1.2.2 Répartition géographique 26
2. Description de la famille des Myrtacées 27
2.1 *Eucalyptus polybractea* R. T. Baker 27
2.1.1 Taxonomie et description botanique 27
2.1.2 Répartition géographique 28
3. Description de la famille des Astéracées 29
3.1 *Ormenis mixta* (L.) Dumort 29
3.1.1 Taxonomie et description botanique 29

3.2.2 Répartition géographique 30
Partie II : Matériel et Méthodes 33
I. Matériel végétal 34
1. Récolte du matériel végétal 34
2. Extraction des huiles essentielles 35
II. Analyse phytochimique par Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse 37
III. Etude de l'activité antimicrobienne des HEs 37
1. Souches microbiennes cibles 37
2. Caractéristiques des souches bactériennes et fongiques étudiées 38
2.1 Souches bactériennes testées 38
2.1.1 *Escherichia coli (E. coli)* 38
2.1.2 *Staphylococcus aureus (S. aureus)* 38
2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* 38
2.1.4 *Bacillus cereus (B. cereus)* 38
2.2 Souche fongique testée : *Candida albicans* (*C. albicans*) 39
3. Conservation des souches 40
4. Milieux de culture 40
5. Préparation des micro-organismes (culture fraiche) 40
6. Préparation de la solution BaSO4 (0,5 McFarland) 41
7. Préparation d'inoculum 41
7.1 Bactéries 41
7.2 Levures 41
8. Diffusion sur disque d'agar 41
9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 43
10. Concentration minimale Fongicide (CMF) / Bactéricide (CMB) 45
11. Détermination des rapports CMF/CMI et CMB/CMI 45
IV. Optimization de l'activité antimicrobienne : Méthode de Damier 46
1. Matériel végétal 46
2. Cultures microbiennes 46
3. Activité antimicrobienne : détermination de la Concentration Inhibitrice Fractionnaire (CIF) 46
4. Combinaisons binaires 48
V. Optimization de l'activité antimicrobienne par application du plan d'expèrience 48
1. Matériel végétal 48
2. Cultures microbiennes 48
3. Plan de mélange et analyse statistique 49
3.1 Identification des facteurs et réponses 49
3.2 Plan de mélange utilisé et matrice d'expériences 49
4. Préparation des mélanges 51
5. CMIs des mélanges 51
6. Modèle mathématique 52
7. Analyse statistique 52

VI. Effet anti-adhésion 53
1. Préparation du matériau 53
2. Souches bactérienne testées 53
3. Traitement de la résine acrylique 54
4. Mesures de l'angle de contact 54
5. Mesures de l'énergie libre de surface et de l'hydrophobicité 55
6. Évaluation de l'adhésion 55
7. Expérience d'anti-adhésion 56
8. Microscopie électronique à balayage (MEB) 56
VII. Activité antioxydante des HEs 56
1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH 56
2. Pouvoir réducteur 57
3. Optimisation de l'activité antioxydante par application du plan de mélange 58
3.1 Matériel végétal 58
3.2 Réponses choisies 58
3.3 Plan de mélange et analyse statistique 58
3.3.1 Plan de mélange utilisé et identification des facteurs et des réponses 58
3.3.2 Matrice d'expériences et modèle mathématique 59
3.4 Analyse statistique et optimisation 60
3.4.1 Analyse statistique 60
3.4.2 Outils de l'optimisation 60
Partie III : Résultats et Discussion 61
I. Description, rendement et compositions chimiques des huiles essentielles 62
1. Rendement et caractéristiques des huiles essentielles 62
2. Analyse de la composition chimique des HEs par CPG/MS 63
II. Activité antimicrobienne 72
1. Diffusion sur disque d'agar - Criblage antimicrobien 72
2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) 76
3. Concentration minimale Fongicide (CMF) / Bactéricide (CMB) 82
4. Activité antimicrobienne : Concentration inhibitrice fractionnaire et indice de concentration inhibitrice fractionnaire 85
III. Formulation par le plan de mélange : activités antibactériennes 97
1. Plan d'expérimentation 97
2. Validation statistique du modèle postulé 98
2.1 *E. coli* 98
2.2 *S. aureus* 99
2.3 *C. albicans* 101
3. Effets des facteurs et modèles ajustés 102
3.1 *E. coli* 102
3.2 *S. aureus* 102
3.3 *C. albicans* 103

4. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité 104
4.1 Efficacité de la formulation des HEs contre *E. coli.* 105
4.2 Efficacité de la formulation des HEs contre *S. aureus.* 107
4.3 Efficacité de la formulation des HEs contre *C. albicans.* 109
5. Confirmation de l'activité antibactérienne des mélanges obtenus 112
6. Effet synergique entre les HEs 113
IV. Activité antibiofilm / antiadhésive 116
1. Effet des HEs et leurs mélanges optimaux sur les propriétés physicochimiques de la résine 116
2. Evaluation de l'adhésion bactérienne à la surface de résine acrylique 119
V. Activité antioxydante 124
1. Piégeage du radical libre DPPH 125
2. Pouvoir réducteur ferrique 127
3. Discussion 128
VI. Formulation par le plan de mélange : activités anti-oxydantes 131
1. Plan d'expérimentation 131
2. Validation statistique du modèle postulé 132
2.1 Piégeage du radical libre DPPH• 132
2.2 Pouvoir réducteur ferrique 133
3. Effets des facteurs et modèles ajustés 135
3.1 Piégeage du radical libre DPPH• 135
3. 2. Pouvoir réducteur ferrique 135
4. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité 136
4.1 Optimisation du CI_{50}-DPPH 137
4.2 Optimisation du pouvoir réducteur 139
4.3 Optimisation simultanée des deux réponses 141
5. Validation expérimentale des conditions optimales 142
6. Discussion 143
Conclusion et Perspectives 146
Références Bibliographiques 150

Liste des Abréviations

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ANPMA : Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine-triphosphate

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Butylhydroxytoluène

CAT : Catalase

CE_{50} : Concentration efficace médiane

CI_{50} : Concentration inhibitrice médiane

CIF : Concentration Inhibitrice Fractionnaire

CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMF : Concentration minimale Fongicide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse

DL_{50} : Dose Létale médiane

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2′-Diphényl-1-picrylhydrazyl

ECR : Espèces chimiques réactives

EMB : Gélose éosine au bleu de méthylène

EPHE : Huile Essentielle d'*E. polybractea*

EPS : Substances polymériques extracellulaires

FRAP : Ferric Reducing Ability of Plasma

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

HEs : Huiles essentielles

ICIF : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire

IK : Indice de Kovats

JT : Journées de travail

LB : Milieu Luria-Bertani

LBHE : Huile Essentielle de *L. burnatii*
LPS : Lipopolysaccharide

MEB : Microscope électronique à balayage

MEP : 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate

MH : Gélose de Mueller Hinton

MS : Spectres de masse

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

MVA : Acide mévalonique

NaCl : Chlorure de sodium

NIST : National Institute of Standards and Technology

OMHE : Huile Essentielle d'*O. Mixta*

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales

pH : Potentiel Hydrogène

PI : Pourcentage d'inhibition

PMMA : Poly méthyl méthacrylate

RAM : Résistance aux antimicrobiens

RNS : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

SOD : Superoxyde dismutase

TPTZ : Tripyridyltriazine

UFC : Unité Formant Colonie

YPG : Yeast peptone glucose

Liste des Figures

Figure 1. Étapes de la formation des biofilms (adapté de Davies, 2011). 16
Figure 2. Mode d'action antibactérien des HEs (adapté de Bouyahya et al. 2017). 17
Figure 3. Schéma montrant le stress oxydant (élaboré par Jeddi mohamed). 19
Figure 4. Photographie originale de la partie aérienne de *Lavandula angustifolia* (Photo prise par Jeddi Mohamed) 24
Figure 5. Photographie originale de la partie aérienne de *Lavandula burnatii* (Photo prise par Jeddi Mohamed). 26
Figure 6. Photographie originale de la partie aérienne d'*Eucalyptus polybractea* (Photo prise par Jeddi Mohamed). 28
Figure 7. Photographie originale de la partie aérienne d'*Ormenis mixta* (Photo prise par Jeddi Mohamed). 30
Figure 8. Montage expérimental de l'hydrodistillation (type Clevenger). (Société BIOPAM). 36
Figure 9. Etapes de préparation des suspensions microbiennes. 42
Figure 10. Schéma descriptif de la méthode de diffusion sur disque d'agar. 42
Figure 11. Schéma descriptif de la méthode déterminant la CMI (Adoptée par Mohamed Jeddi). 44
Figure 12. Schéma descriptif de la méthode déterminant l'indice de CIF. 47
Figure 13. Positions des points expérimentaux pour le plan Simplex-centroïde augmenté (Goupy and Creighton, 2007). 50
Figure 14. Chromatogramme d'analyse par GC-MS des HEs de (a) *E. polybractea,* (b) *O. mixta,* (c) *L. burnatii* et (d) *L. angustifolia.* 65
Figure 15. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs prédites pour la souche *E. coli*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées. 99
Figure 16. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la souche *S. aureus*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées. 100
Figure 17. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la souche *C. albicans*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées. 101
Figure 18. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *E. coli*. 106
Figure 19. Profil de désirabilité révélant les proportions précises des HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et de *L. burnatii* (LBHE), conduisant à une activité antibactérienne optimale contre la souche *E. coli*. 107

Figure 20. Profil de mélange 2D et 3D, illustrant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *S. aureus*..... 108
Figure 21. Profil de désirabilité montrant les proportions optimisées des trois HEs étudiées conduisant à une activité antibactérienne optimale contre la souche *S. aureus*. 109
Figure 22. Profil de mélange 2D et 3D, affichant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *C. albicans*. 110
Figure 23. Graphique de désirabilité montrant les proportions précises des trois HEs étudiées conduisant à la meilleure action antifongique vis-à-vis *C. albicans*. 111
Figure 24. Profil de mélange montrant la zone de combinaison optimale entre les HEs d'*O. mixta* (OMHE), d'*E. polybractea* (EPHE) et de *L. briquit* (LBHE) contre toutes les souches microbiennes testées. 113
Figure 25. Analyse au MEB de l'adhésion de *S. aureus* à la surface..... 119
Figure 26. Analyse au MEB de l'adhésion de *E. coli* à la surface. 119
Figure 27. Analyse MEB (×2000) de l'adhésion de *S. aureus* avec (A) l'HE de *E. polybractea*, (B) l'HE d'*O. mixta*, (C) l'HE de *L.briquet* et (D) Mélange 2. 120
Figure 28. Analyse MEB (×2000) de l'adhésion de *E. coli* avec (A) l'HE de *E. polybractea*, (B) l'HE d'*O. mixta*, (C) l'HE de *L.briquet* et (D) Mélange 1. 121
Figure 29. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les HEs étudiées. 126
Figure 30. Pouvoir réducteur (CE_{50}) des HEs d'*E. polybractea, L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta*, comparée aux antioxydants standards (acide ascorbique et BHT). 127
Figure 31. Courbe des valeurs de DPPH IC_{50} observées en fonction des valeurs prédites. 133
Figure 32. Représentation des valeurs observées en fonction des valeurs prédites. 134
Figure 33. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la meilleure valeur de la réponse DPPH-CI50 (mg/mL) en fonction des trois composants……..138
Figure 34. Profil de désirabilité illustrant les proportions précises des HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et de *L. burnatii* (LBHE), conduisant à la valeur optimale de la réponse DPPH-$_{IC50}$. 139
Figure 35. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la meilleure valeur de la réponse pouvoir réducteur (CE_{50}) en fonction des trois composants. 140
Figure 36. Profil de désirabilité montrant les proportions optimisées des trois HEs étudiées conduisant à la valeur optimale de la réponse du pouvoir réducteur (CE_{50}). 141
Figure 37. Profil de désirabilité de l'optimisation simultanée montrant les proportions précises des trois HEs testées, conduisant à des valeurs optimales pour les deux réponses (CI_{50} du DPPH et CE_{50} du pouvoir réducteur). 142

Liste des Tableaux

Tableau 1. Activités biologiques et l'activité antioxydante des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et *L. angustifolia*..... 31
Tableau 2. Plantes aromatiques et médicinales étudiées. 35
Tableau 3. Quelques caractéristiques des souches microbiennes étudiées..... 39
Tableau 4. Milieux de culture et conditions d'incubation en fonction des microorganismes étudiés. 40
Tableau 5. Effets bactériostatiques /fongistatiques et bactéricides/fongicides des HEs. 45
Tableau 6. Différentes combinaisons des huiles essentielles. 48
Tableau 7. Identification des facteurs étudiées..... 49
Tableau 8. Identification des réponses étudiées. 49
Tableau 9. Matrice d'expérience générée..... 51
Tableau 10. Caractéristiques énergétiques (mJ/m2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact. 54
Tableau 11. Identification des variables indépendantes utilisées dans le mélange..... 58
Tableau 12. Matrice des expériences générées..... 59
Tableau 13. Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées. 62
Tableau 14. Composition chimique de l'huile essentielle des quatre plantes étudiées**.** 66
Tableau 15. Diamètres d'inhibition des HEs et des antibiotiques par rapport aux souches testées. 73
Tableau 16. CMI des HEs étudiées vis-à-vis des souches testées. 77
Tableau 17. Concentrations minimales bactéricides (CMB) et Concentrations minimales fongicides (CMF) des HEs étudiées..... 82
Tableau 18. Effet Bactériostatique-Fongistatique/ Bactéricide-Fongicide des HEs étudiées. 84
Tableau 19. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°1 (*E. polybractea* / *O. mixta*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans.*..... 86
Tableau 20. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°2 (*E. polybractea* / *L. angustifoli*a) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans.* 88
Tableau 21. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°3 (*E. polybractea* / *L. burnatii*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans.*..... 90
Tableau 22. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°4 (*L. angustifolia* /*O. mixta*) contre les souches *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans.*..... 91
Tableau 23. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°5 (*L. burnatii* / *O. mixta*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans.*..... 92

Tableau 24. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°6 (*L. angustifolia* / *L. burnatii*) contre les souches *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*. 93
Tableau 25. Diverses combinaisons générées par le plan de mélange sélectionné et les réponses expérimentales obtenues pour chaque souche microbienne testée. 98
Tableau 26. Analyse de la variance du modèle ajusté contre *E. coli*. 99
Tableau 27. Analyse de la variance du modèle postulé contre *S. aureus.* 100
Tableau 28. Analyse de la variance du modèle postulé contre *C. albicans*. 101
Tableau 29. Coefficients de régression estimés pour le modèle adopté contre *E. coli.* 102
Tableau 30. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté contre *S. aureus.* 103
Tableau 31. Coefficients de régression estimés pour le modèle adopté contre *C. albicans*. 104
Tableau 32. Valeurs prédites et expérimentales de la CMI pour le point de test réalisé par les mélanges optimaux trouvés. 112
Tableau 33. Valeurs d'angle de contact (θ), des paramètres de tension superficielle (γ^+ et γ^-), des composants apolaires (γ^{LW}) et polaires (γ^{AB}), de l'hydrophobicité (ΔG_{iwi}) de la surface de résine non traitée et traitée. 118
Tableau 34. Pourcentage de la surface couverte de la résine acrylique par *S. aureus* et *E. coli* non traité et traité par les trois HEs et leurs MO1 et MO2 examiné par le logiciel MATLAB. 122
Tableau 35. Valeurs de CI_{50} des HEs et des standards contre le radical DPPH. 126
Tableau 36. Diverses combinaisons générées par le plan de mélange choisi et les réponses expérimentales obtenues pour chaque essai. 131
Tableau 37. Analyse de la variance (ANOVA) du modèle ajusté. 132
Tableau 38. Analyse de la variance (ANOVA) du modèle ajusté. 134
Tableau 39. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté et leur signification statistique (p-value). 135
Tableau 40. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté et leur signification statistique (p-value). 136
Tableau 41. Valeurs prédites et expérimentales pour le point de test réalisé par les mélanges optimaux trouvés. 143

Introduction générale

L'émergence de la résistance aux antimicrobiens est désormais un défi majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En effet, Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la résistance aux antimicrobiens est responsable d'environ 700 000 décès chaque année et pourrait devenir l'une des principales causes de mortalité dans le monde d'ici 2050 (OMS, 2021). Ce phénomène de résistance est aggravé par l'usage exagéré et injustifiable des antibiotiques, entraînant la sélection de souches microbiennes résistantes (Moussa, 2021). Ainsi, les antibiotiques synthétiques perdent progressivement leur efficience, sans pouvoir être remplacés par d'autres. D'où la nécessité croissante de découvrir des agents antimicrobiens nouveaux et efficaces (Mujawah et al., 2022). En outre, les bactéries constituant des biofilms jouent un rôle crucial dans les infections nosocomiales liées à une mortalité élevée du fait des choix thérapeutiques restreints (Zouine et al., 2022). Les biofilms sont des associations denses et structurées de micro-organismes entourées d'une matrice extracellulaire, qui se développent sur des surfaces telles que des tissus vivants, des appareils médicaux et agro-industriels, des systèmes de distributions d'eau et dans les systèmes naturels aquatiques (Ashrafudoulla et al., 2021). En fait, la formation de biofilms et l'intégration ultérieure des bactéries dans une matrice complexe peuvent accroître leur résistance aux désinfectants et aux antimicrobiens, rendant ainsi ces micro-organismes difficiles à contrôler et à éradiquer (Er Raouan et al., 2023; Sadiki et al., 2016). Car, la matrice des substances polymériques extracellulaires (EPS) garantit la protection des cellules bactériennes contre les antibiotiques, limitant ainsi la pénétration de ces agents à des concentrations bactéricides (Achinas et al., 2019). Par conséquent, les bactéries formant un biofilm sont considérablement plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries planctoniques (Caraher et al., 2007).

Par ailleurs, l'adhésion microbienne à la surface des substrats, est généralement considérée comme la première étape du processus de formation d'un biofilm, impliquant une fixation réversible et non spécifique des micro-organismes sur les surfaces (Benkhaira et al., 2023; Sadiki et al., 2015). D'où l'interêt de rechercher des substance à potentiel anti-adhésif, pour éviter les problèmes liés à ce processus dans differents secteurs.

De plus, le stress oxydatif, un autre problème majeur de santé publique, suscite énormément d'attention. Se définissant comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants dans l'organisme, résultant d'une surproduction de radicaux libres (Oztetik, 2011). Le stress oxydatif joue un rôle crucial dans le développement de plus d'une centaine de maladies humaines

distinctes, notamment le diabète, le cancer, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, l'athérosclérose, ainsi que le vieillissement prématuré de la peau (Chatterjee, 2016; García-Sánchez et al., 2020). Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés, mais peuvent montrer des effets secondaires toxiques (Vijaya Lobo et al., 2010; Tortosa et al., 2020), d'où l'intérêt croissant de l'utilisation de substances naturelles en tant qu'antioxydants.

De tout temps, l'homme a puisé dans la nature afin de satisfaire ses besoins en médicaments, en nourriture, en matières premières et en abris. Ainsi, la survie de l'humanité est étroitement associée à l'existence des ressources naturelles, dont les espèces végétales constituent, aux côtés des espèces animales et minérales, une composante fondamentale. Dès l'origine, les êtres humains ont exploité les plantes, non seulement pour se nourrir, se chauffer, se parfumer, aromatiser les aliments mais aussi pour se soigner (Giannenas et al., 2020). En effet, les plantes contiennent une vaste variété de substances chimiques dotées de différentes propriétés thérapeutiques et manifestent de nombreuses activités biologiques (antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, antifongiques, antibiofilms, antivirales, antimorales, etc ..) (Angane et al., 2022; Chraibi et al., 2021; Dhifi et al., 2016).

Depuis des millénaires, de nombreuses plantes ont été employées par l'humanité pour remédier à divers troubles de santé. En effet, de nombreuses civilisations ont utilisé les plantes aromatiques et médicinales (PAMs), comme ressources sanitaires et médicales (El Hachlafi et al., 2023d; Srivastava et al., 1996). Actuellement, une grande partie de la population mondiale, notamment dans les pays en voie de développement, a recours à ces plantes pour répondre à ses besoins médicaux primaires (Al-Mijalli et al., 2022). On estime que près de 80 % de la population des pays en voie de développement utilise des produits dérivés de PAMs, pour l'automédication (OMS, 2013).

Au Maroc, tout comme dans de nombreux autres pays en voie de développement, les plantes médicinales persistent à répondre à un besoin thérapeutique crucial, en dépit de l'évolution du système de santé moderne (El Hachlafi et al., 2023a; Khouchlaa et al., 2017). Ces usages médicaux populaires, profondément ancrés dans la culture de cette communauté, sont associés à l'histoire ancienne, à la diversité ethnique et aux conditions socioculturelles (El-Hilaly et al., 2003). Le Maroc offre non seulement une richesse culturelle, mais également une diversité floristique exceptionnelle.

D'après les statistiques les plus récentes, la flore vasculaire du Maroc est estimée à 3913 espèces et 1298 sous-espèces, réparties en 155 familles et 981 genres. En outre, le nombre d‘espèces endémiques s‘élève à 640, ce qui représente 16 % de la flore nationale totale (Fennane and Tattou, 2008a; Najem et al., 2019). Cette biodiversité végétale constitue une riche source de (PAMs), comprenant environ 800 espèces, qui sont exploitées depuis longtemps par les communautés marocaines, représentant ainsi une médecine traditionnelle exceptionnelle (OMS).

Compte tenu de ces données, le défi qui s’impose est de valoriser cette richesse tout en préservant et en protégeant les ressources naturelles grâce à une exploitation raisonnable des (PAMs), notamment de leurs huiles essentielles (HEs). Les HEs sont constituées d'un ensemble de composés bioactifs dotés de nombreux effets biologiques intéressants, tels que leur action antibactérienne, antifongique, antioxydante et anti-biofilm (Angane et al., 2022; Dhifi et al., 2016; Mouhoub et al., 2023). De ce fait, elles ont été employées dans divers domaines, notamment en pharmacie, en médecine, en cosmétique et en alimentation. En raison de ces propriétés prometteuses, les HEs peuvent être utilisées pour traiter divers problèmes, notamment la résistance acquise par les microorganismes aux agents antimicrobiens, la toxicité des antioxydants chimiques synthétiques utilisés comme conservateurs, à savoir le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA), ainsi que les problèmes liés à la formation de biofilm sur les surfaces.

Par ailleurs, l'utilisation d'une approche de conception de mélanges peut présenter une alternative intéressante vu ses applications technologiques, notamment dans le secteur alimentaire. En effet, au cours des deux dernières décennies, l’application des mélanges dans ce secteur a connu un intérêt grandissant, grâce à son potentiel de prolonger la durée de conservation et renforcer les propriétés sensorielles des aliments, ainsi que d’améliorer les emballages actifs (Squeo et al., 2021). Dans ce sens, la formulation d'un mélange spécifique d’HEs doit tenir compte des constituants employés, notamment de leur pourcentage relatif dans la combinaison (Chraibi et al., 2023; Jeddi et al., 2023b). De plus, l'adoption d'une méthodologie des plans d'expériences permet de minimiser le nombre d'essais et de prédire avec précision la formulation optimale (Chraibi et al., 2021).

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une thèse de doctorat, menée au sein du laboratoire de biotechnologie microbienne & molécules bioactives (LBM2B), et a pour objectif principal d’approfondir les connaissances relatives aux HEs de quatre plantes aromatiques et médicinales, à

savoir *Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta*, *Lavandula burnatii* et *Lavandula angustifolia*, et de contribuer à leur valorisation. Pour cela, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

- ✓ La caractérisation des profils chimiques des quatre HEs étudiées,
- ✓ L'investigation de leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antibiofilms.
- ✓ L'étude de la combinaison des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii* et *O. mixta* en tant qu'agents antimicrobiens et antioxydants.
- ✓ Le développement des formulations optimales contre la formation de biofilms d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* à la surface de la résine acrylique à l'aide du plan de mélange.

Afin d'atteindre ces objectifs, notre projet de recherche sera réparti en 8 axes :

Le 1er axe concerne une revue bibliographique, rapportant l'historique des plantes médicinales, les diverses connaissances relatives aux HEs et leurs propriétés biologiques et antioxydantes. De plus, une description et un aperçu global sur l'état des connaissances des espèces végétales étudiées.

Le 2ème axe englobe la récolte du matériel végétal, l'extraction et l' analyse phytochimique des HEs.

Le 3ème axe concerne le criblage de l'activité antimicrobienne des HEs des plantes étudiées vis-à-vis de cinq souches microbiennes.

Le 4ème axe décrit l'évaluation de l'activité antimicrobienne à travers l'étude des mélanges binaires des HEs des quatres espèces à l'aide de la méthode de damier.

Le 5ème axe vise à développer les formulations des huiles d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* pour optimiser leurs activités antimicrobiennes, à l'aide des plans d'expériences.

Le 6ème axe décrit l'activité antiadhésive des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* pures, ainsi que de leurs formulations optimales élaborées dans l'axe précédent, vis-à-vis des souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* formées à la surface de la résine acrylique.

Le 7ème axe décrit l'évaluation de l'effet antioxydant des HEs des quatres plantes étudiées.

Le 8ème axe développe les formulations des huiles d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* afin d'optimiser leurs activités antioxydantes, à l'aide des plans d'expériences.

Finalement, cette thèse est achevée par une conclusion générale et quelques perspectives pour une éventuelle voie de recherche plus approfondie.

Partie I : Revue Bibliographique

I. Généralités sur les plantes médicinales

1. Historique

L'utilisation des plantes médicinales est une pratique ancrée dans l'histoire de l'humanité, remontant à des millénaires. En effet, depuis l'Antiquité, les civilisations à travers le monde ont exploité les propriétés des plantes pour traiter un large éventail de maladies. Ainsi, l'histoire des plantes médicinales est un témoignage de la relation intime entre l'homme et la nature dans sa quête pour la santé et la guérison (Bellakhdar, 1997).

Il y a cinq mille ans, les premiers écrits sur les vertus thérapeutiques des plantes ont vu le jour. Parmi eux, des ouvrages emblématiques comme le Pen-Tsao, manuscrit de médecine chinoise datant de 2800 av JC, ou le papyrus Ebers, issu de l'ère pharaonique égyptienne de la sixième dynastie ont consigné une multitude de remède à base des plantes. Ensuite, Hippocrate, éminent médecin Grec, a profondément défendu l'utilisation des herbes dans le traitement des maladies, une approche qui a été étendue par Dioscoride et Galien. Ce dernier, pionnier de la médecine a élaboré la « pharmacie Galénique » et a perfectionné l'usage des médicaments végétaux. Au moyen Age, les moines ont joué un rôle crucial dans l'enrichissement de la médecine, en particulier l'abbesse sainte Hildegarde au XII^{ème} siècle. Leur travail de recherche et de préservation des connaissances médicales a contribué à perpétuer l'héritage de l'usage des plantes médicinales a élargi la compréhension des traitements naturels au fil des siècles (Boullard, 2001; Fiorini, 2003).

Au XIII^{ème} siècle, les Arabo-musulmans ainsi que les Hispano-arabes d'Al-Andalus ont également contribué de manière significative au domaine de la médecine et la pharmacie,. Ibn Al Baytar a notamment compilé dans une œuvre monumentale intitulée « **Al- Jāmi' li-mufradāt al-adwiyah wa-al-aghdhiyah**» l'ensemble des connaissances relatives aux plantes médicinales. Cette œuvre qui comportait une liste impressionnante de 1400 préparations et plantes médicinales, témoigne de la richesse des savoirs accumulés à cette époque dans le domaine de la pharmacopée (Fouché et al., 2000). Ce qui a préparé le terrain pour l'émergence d'une véritable science pharmacologique.

Au XIX^{ème} siècle, des avancées majeures en phytochimie ont marqué une nouvelle ère dans l'histoire des PAMs. En effet, les chimistes se sont lancés dans l'isolement des principes actifs des plantes, ouvrant ainsi la voie à une meilleure compréhension de leurs effets thérapeutiques.

En 1804, Seguin a réussi à isoler la morphine de l'Opium, l'année suivante Vauquelin et Robiquet ont extrait et décrit l'asparagine, ainsi que la narcotine et la codéine (Lafont, 2017).

Ensuite, Pelletier, Caventou et Runge ont réalisé un autre progrès majeur en isolant la caféine en 1819 et l'émétine à partir de l'ipécacuanha (Weinberg and Bealer, 2004). En 1818, Caventou et Pelletier ont découvert la strychnine, puis la brucine l'année suivante (Pelletier and Caventou, 1818). Plus tard, en 1868, Hesse et Geiger ont isolé l'atropine, suivis par Amnaud qui a isolé l'oubaine en 1988 (Hesse, 2002).

Au début du XXème siècle, les efforts pour comprendre les propriétés médicinales des plantes se sont intensifiés. Les études sur les curares, menées par King (1935), et les recherches de Marker sur les sapogénines en 1940 ont marqué cette période (Marker et al., 1940). A partir de là, la chimie de synthèse a progressivement remplacé les plantes dans le développement de l'industrie pharmaceutique florissante. Au milieu du siècle, l'intérêt des chimistes s'est à nouveau tourné vers le règne végétal. La découverte en 1947 de l'ajmalicine et de la réserpine dans les Rauwolfias a constitué une avancée majeure, marquant une nouvelle étape dans l'histoire des médicaments. Par la suite, des composés comme vincaleucoblastine et la vincristine, isolés en 1961, les ellipticines à partie des Euchrosia en 1966, ainsi que la maytansine, un agent antitumoral extrait des Maytenus en 1972, ont été identifiés. Plus récemment, des composés de type quassinoides isolées des Simarubacées ont également suscité l'intérêt. Parallèlement, une nouvelle perspective émergeait à l'égard des pharmacopées traditionnelles. Les plantes, sources de substances actives telles que les essences, les extraits totaux, les gommes et les résines, ont été réexaminées avec nouvel élan pendant cette période.

Aujourd'hui, alors que l'efficacité des médicaments traditionnels, tels que les antibiotiques, diminue en raison du développement de la résistance des bactéries, les traitements à base de plantes retrouvent une place de choix. La phytothérapie, offrant des remèdes naturels bien acceptés par l'organisme, connait un essor remarquable en Occident, en particulier dans le traitement des maladies chroniques. Cette tendance reflète non seulement une recherche d'alternatives aux médicaments synthétiques, mais aussi une reconnaissance croissante des bienfaits des plantes dans le maintien de la santé et le traitement des affections à long terme (Iserin et al., 2007).

2. Plantes médicinales au Maroc

Au Maroc, les plantes médicinales constituent une richesse florale pour le pays grâce à sa position géographique dans la région méditerranéenne qui lui confère un climat varié, caractérisé par la présence de quatre étages bioclimatiques : Aride, Semi-Aride, Humide et Sub-humide.

Cette diversité climatique favorise la croissance de différentes plantes en offrant une variété de niches écologiques, ce qui permet également aux espèces de s'adapter aux conditions spécifiques de leur environnement (Daget, 1977; Rankou et al., 2013).

Au Maroc, les PAMs représentent un secteur socio-économique majeur, avec des productions significatives et une présence notable sur les marchés mondiaux. Cependant, malgré la diversité botanique du pays, seules environ 80 à 100 espèces sont actuellement exploitées, selon les données de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (ANPMA). Le Maroc exporte environ 22 000 tonnes de PAMs / an, le classant ainsi au 12ème rang des exportateurs mondiaux. Cette activité crée également des milliers de journées de travail (environ 500 000 JT), principalement dans les régions rurales isolées. Par conséquent, l'exploitation des PAMs au Maroc contribue non seulement à l'essor économique des zones concernées, mais aussi à la préservation des savoirs traditionnels et à la consolidation des équilibres commerciaux régionaux.

La flore du Maroc offre une diversité remarquable, comptant 981 genres au total, répartis dans différentes catégories : 25 pour les *Pteridophyta ;* 8 *Pinophyta ;* 225 *Monocotyledonae* ; 723 *Dicotyledonae.* Ces genres appartiennent à 155 familles. Parmi celles-ci, les trois premières familles, à savoir les *Asteraceae*, les *Fabaceae* et les *Poaceae*, dominent avec un total de 1329 espèces. De plus, certaines familles se démarquent également : les *Brassicaceae*, les *Lamiaceae* et les *Caryophyllaceae* comptent chacune plus de 200 espèces, tandis que les *Apiaceae* et les *Scrophulariaceae* ont chacune plus de 100 espèces. Ce qui démontre la richesse et la variété de la flore marocaine, offrant un écosystème diversifié et complexe (Fennane and Tattou, 2008).

II. Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont des essences liquides extraites des plantes, hautement concentrés et complexes, et se composent principalement de substances volatiles et odorantes produites par de nombreux végétaux.

Ces substances sont générées par des cellules sécrétrices dans le cadre du métabolisme secondaire des plantes et sont stockées dans des poches à essences spécifiques à certains organes de la plante (Dhifi et al., 2016; Lahlou, 2004). Typiquement, les HEs renferment entre 20 et 60 composants, voire plus de 100, présents à des concentrations variables. Parmi eux, il y a des composés majeurs se distinguent par leur concentration élevée, oscillant entre 20 et 70 % (monoterpènes, de sesquiterpènes, alcools, esters, aldéhydes, oxydes, etc…) (Bouratoua et al., 2014). Tandis que les autres sont présents en quantités minimes (Bilia et al., 2014). Cette composition chimique complexe confère aux HEs leurs propriétés et leurs diversités d'applications dans différents domaines tels que, l'industrie agroalimentaire, application biomédicale, textiles, cosmétique, la parfumerie... (Jugreet et al., 2020).

2. Composition chimique des HEs

La composition chimique des HEs peut varier au sein d'une même espèce, ce qui peut être attribué à divers facteurs tels que le stade phylogénétique, la maturité de la plante, les conditions édaphiques et climatiques, l'origine géographique, les méthodes de récolte, ainsi que le mode d'extraction et la durée de conservation (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Kirimer et al., 2017). Généralement, les HEs sont principalement constituées de deux grands groupes chimiques distincts que l'on appelle les composés majoritaires : les terpènes, qui comprennent les mono- et les sesquiterpènes, et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Laid et al., 2008).

2.1 Terpènes

La famille de composés chimiques de terpènes est très répandue dans les plantes et se présente sous différentes formes, telles que les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30). Ces composés partagent les mêmes origines métaboliques que les unités isoprènes (C5), qui sont à la base de leur activité biologique (Lieu et al., 2024). Les composés terpéniques sont subdivisés en fonction de leurs rôles et de leurs structures. Il se répartissent en différentes classes : les alcools (le géranéol et le linalol) ; les aldéhydes (ciral et le citronella) ; les cétones (menthone, camphre et thuyone) ; les esters (l'acétate de linalyle) et les éthers-oxydes (cinéole). Leur structure peut également varier et être linéaire comme le franésène et le farnésol, ou cyclique, avec des molécules monocycliques telles que l'humulène et le zingibérène, des molécules bicycliques comme le cadinène, le caryophyllène et le chamazulène, ou encore des molécules tricycliques à l'instar du cubébol, du patchoulol et du viridiflorol (Tadrent et al., 2016).

La voie de l'acide mévalonique (MVA) et celle du 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) sont les précurseurs de l'isoprène, l'isopentényle et du diphosphate diméthylallyle (Bergman et al., 2019).

2.2 Monoterpènes

Les monoterpènes, avec une formule chimique de $C_{10}H_{16}$, résultent de l'association de deux unités isoprèniques par un couplage tête-queue. Ils sont largement répandus dans la plupart des HEs constituant environ 90% de leur composition totale et présentent une diversité structurale (Nguyen-Ngoc et al., 2024).

2.3 Sesquiterpènes

Pour produire des sesquiterpènes, les hydrocarbures $C_{15}H_{24}$ sont le plus souvent associés à trois unités d'isoprène. Parmi les nombreuses classes de terpènes, ce sont eux qui présentent la plus grande variété, se manifestant sous la forme d'hydrocarbures ou d'hydrocarbures oxygénés et formant une variété de structures différentes, y compris acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique et polycyclique. Les fonctions et les structures de ces composés sont très similaires à celles des monoterpènes, malgré leur diversité (Tsigoriyna et al., 2024).

2.4 Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont une autre catégorie de composés volatils présents dans les HEs, moins répandus que les composés terpéniques mais néanmoins importants. Ils dérivent du phénylpropane et se caractérisent par un cycle aromatique associé à une chaine de trois atomes de carbone propène (C_6-C_3) (Dejouhanet and Pinton, 2023; Annemieke Ultee et al., 2002). Cette catégorie englobe des composés odorants produits par une voie métabolique secondaire d'acide shikimique. Parmi ces composés volatils, on trouve l'eugénol, l'estragole, la vaniline, l'anéthole, ainsi que d'autres composés (Roosta et al., 2017; Samarth et al., 2017).

3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs vise à récupérer les métabolites secondaires volatils des plantes, provenant de diverses parties de la plante afin d'obtenir un produit aromatique concentré. Cependant, la qualité et le rendement des HEs sont des aspects cruciaux qui dépendent du processus de production.

Actuellement, plusieurs techniques d'extraction, telles que l'hydrodistillation, la distillation par entrainement à la vapeur, l'extraction par solvant, et la macération sont largement utilisées. Mais ces méthodes traditionnelles présentent des inconvénients tels qu'une efficacité limitée, un temps d'extraction prolongé, une perte de composés volatils et une accumulation de résidus de solvants toxiques (Tavakolpour et al., 2017).

Pour surmonter ces défis, des approches alternatives plus avancées, telles que l'extraction assistée par fluide supercritique, par micro-ondes et par ultrasons (méthodes conventionnelles), ont été développées (Jugreet et al., 2020; Reyes-Jurado et al., 2020).

La comparaison entre différentes techniques de distillation révèle des variations significatives en termes de rendement en HEs, de composition chimique, d'économie d'énergie et de temps d'extraction. Dans une étude portant sur l'extraction de *Zingiber corallinum*, la distillation par entraînement à la vapeur et l'extraction par fluide supercritique ont révélé deux compositions chimiques distinctes, la première présentant moins de composés (Zhannan et al., 2009). La distillation par entrainement à la vapeur s'est avérée la plus adaptée pour l'extraction du 1-menthol, de la menthone et de l'eucalyptol de la menthe poivrée, comparée à l'extraction par hydrodistillation et à l'extraction par fluide supercritique (Ammann et al., 1999). Une comparaison entre l'hydrodistillation et l'extraction assisté par micro-ondes de *Rosmarinus officinalis* L, a montré des rendements similaires, bien que l'HE issue de l'extraction par micro-ondes présente une meilleure activité antioxydante et antibactérienne (Karakaya et al., 2014). Ces études mettent en lumière l'importance de choisir la technique d'extraction la plus appropriée en fonction des objectifs spécifiques de l'extraction d'HEs.

4. Facteurs influençant la composition chimique des HEs

Les HEs sont des extraits volatils de plantes, prisés pour leurs diverses propriétés. Cependant, leur composition chimique, rendement et qualité peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs facteurs clés. Notamment, les HEs extraites des mêmes parties des mêmes plantes dans différentes régions peuvent présenter des différences significatives en termes de composition chimique et de qualité (El-Tarabily et al., 2021; Kirimer et al., 2017). Cette variation est largement attribuée aux conditions environnementales spécifiques à chaque région, qui influencent l'écosystème et par conséquent, la production des HEs (Guerrouf Boutheyna-Mihoubi Fella, 2023).

La méthode d'extraction joue également un rôle crucial dans la qualité et la composition chimique des HEs, car des méthodes inappropriées peuvent entrainer des effets indésirables tels que le changement de couleur, l'altération de la saveur et des changements physiques néfastes pour la qualité des HEs (Pateiro et al., 2018) suite à la destruction ou à la modification des constituants chimiques des HEs, entrainant ainsi la perte de leurs propriétés. En effet, des études ont souligné l'importance de sélectionner des techniques d'extraction adaptées pour préserver l'intégrité des composants des groupes chimique des HEs (Kirimer et al., 2017; Tavakolpour et al., 2017).

En plus de ces facteurs mentionnés précédemment, les facteurs génétiques tels le bagage génétique de chaque plante, ainsi que les mutations et l'hybridation jouent un rôle essentiel dans la qualité, le rendement et la composition des HEs (Amina, 2020; Pelletier, 2024). En outre, la variation des conditions de croissance comprenant la pluviométrie, la température, la lumière et les conditions édaphiques, peuvent entrainer des ajustements métaboliques dans les plantes, influençant ainsi la synthèse et la concentration des composants volatils des HEs (Olle and Bender, 2010). De même une gestion appropriée des pratiques culturales, y compris la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'utilisation d'engrais et les techniques de récolte, jouent un rôle crucial dans la composition chimique des HEs des plantes (Kouassi et al., 2019; Sawa et al., 2018). Les aspects tels que la saison de récolte, les techniques et le temps de séchage utilisées peuvent aussi influencer considérablement la composition chimique des HEs (Koumaglo et al., 2009).

III. Pouvoir antimicrobien des HEs

1. Résistance aux antimicrobiens

Les bactéries résistantes aux antimicrobiens, causant de nombreuses maladies infectieuses, constituent une véritable menace pour la santé humaine et l'économie mondiale (Alibi et al., 2020). Plusieurs facteurs contribuent à ce phénomène, notamment l'explosion démographique, l'expansion industrielle, les changements du mode de vie, la facilité des migrations mondiales, le manque d'infrastructures médicales adéquates dans les pays en développement. Par ailleurs, l'utilisation imprudente d'antimicrobiens (antibiotiques, etc.) a aggravé cette menace latente de la résistance aux antimicrobiens (RAM). Ainsi, la RAM notamment chez les bactéries présentes dans les hôpitaux augmente de façon exponentielle et il a été estimé que, d'ici 2050, elle serait responsable de 700 000 décès chaque année (Boren et al., 2020; OMS, 2021).

Au niveau mondial, entre 2000 et 2010, l'utilisation d'antimicrobiens a augmenté de plus de 30 %, les pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI) étant les principaux contributeurs, en raison de la forte prévalence des maladies infectieuses, la facilité d'accès et du coût réduit des antimicrobiens (Klein et al., 2021). Depuis les 70 dernières années, l'enrichissement considérable des gènes RAM dans la population bactérienne a été attribué aux activités humaines telles que l'utilisation effrénée d'antibiotiques dans les hôpitaux, dans les domaines de l'agriculture, et l'élevage surtout de la volaille (Singer et al., 2016; Ventola, 2015).

2. Formation du biofilm

Les biofilms bactériens sont des structures multiformes de communautés composées de diverses colonies de cellules bactériennes (Kostakioti et al., 2013). Le biofilm fait référence à l'agrégation tridimensionnelle complexe de bactéries attachées à une surface et enfouies de manière inflexible dans une matrice de substance polymérique extracellulaire (EPS). Les bactéries forment des biofilms sur tous les substrats et provoquent des infections chez les plantes, les animaux et les humains (Abebe, 2020; Achinas et al., 2019). En outre, les biofilms jouent également un rôle destructeur dans la corrosion des pipelines industriels (Lekbach et al., 2018). Les biofilms bactériens peuvent s'attacher à divers matériaux tels que les métaux, les surfaces en verre, les articles en plastique, les tissus et les dispositifs cliniques (Bridier et al., 2015). Les communautés bactériennes produisent également des biofilms, en particulier sur tous les implants médicaux, y compris les greffes vasculaires, les valves cardiaques, les dispositifs intra-utérins, les stimulateurs cardiaques, les prothèses articulaires, les cathéters, les sutures et les lentilles de contact pour les infections aiguës (Kannappan et al., 2017).

Les bactéries à l'intérieur du biofilm peuvent également résister à des conditions difficiles et contenir des polymères sécrétés tels que des polysaccharides, de l'ADN extracellulaire (ADNe), des protéines et des protéines amyloïdogènes (Sharma et al., 2019). La pathogenèse et la persistance des agents pathogènes bactériens dépendent de la formation et du maintien de biofilms intacts (de Kraker et al., 2016; Zhang et al., 2014). Les cellules bactériennes enveloppées dans le biofilm sont jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques. En effet, les biofilms protègent les bactéries contre les variations de pH, les carences en nutriments et les forces mécaniques (Singh et al., 2013). Par conséquent, la matrice du biofilm confère une résistance supplémentaire aux bactéries, ce qui conduit à des infections graves.

3. Composants de la matrice du biofilm

Les biofilms sont un regroupement de micro-organismes dans lequel ces derniers produisent des exo-polysaccharides (EPS). Les EPS sont consitués de protéines (<1-2%), polysaccharides (1-2%), l'ADN (<1%) et de l'ARN (<1%) (Abebe, 2020). En plus de ces composants, l'eau (jusqu'à 97 %) est la partie clé du biofilm, distribuée de manière non homogène et principalement responsable du mouvement des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm (Achinas et al., 2019). La capacité à construire et à conserver une communauté de biofilm organisée dépend principalement des composants de la matrice EPS (Ling et al., 2015; Patil and Patel, 2021). L'EPS commande une charte pour les biofilms. Les biofilms sont toujours protégés à l'action des microbes concurrents, température, cellules hôtes, antimicrobiens et dessiccation mais ils ont également accès aux nutriments et ont la capacité de réagir aux changements environnementaux. Les EPS peuvent aider les bactéries à adhérer à de nombreuses surfaces et hôtes différents, fournir une protection contre l'environnement et des réservoirs pour l'acquisition de nutriments (Kannappan et al., 2017).

4. Etapes de formation du biofilm

En général, la formation de biofilms par les bactéries sur n'importe quel substrat/couche implique cinq étapes principales (Kostakioti et al., 2013).

(1) Attachement : à un stade initial, les cellules planctoniques nageant librement s'attachent de manière réversible aux surfaces biotiques ou abiotiques par le biais d'interactions faibles telles que les forces acido-basiques, hydrophobes, de Van der Waals et électrostatiques (Floyd et al., 2017).

(2) Colonisation : les bactéries s'attachent de manière irréversible à la surface par le biais d'interactions plus fortes telles que les protéines adhésives liant le collagène, les lipopolysaccharides, les flagelles et les pili.

(3) Prolifération : les cellules bactériennes multicouches s'accumulent profondément et produisent d'énormes quantités d'EPS.

(4) Maturation : les cellules bactériennes multicouches attachées se développent en biofilm mature avec une structure de biofilm 3D typique.

(5) Dispersion : après son développement complet, le biofilm est désassemblé ou dispersé à l'aide de processus mécaniques et actifs (Craft et al., 2019; Myszka and Czaczyk, 2011) (figure 1).

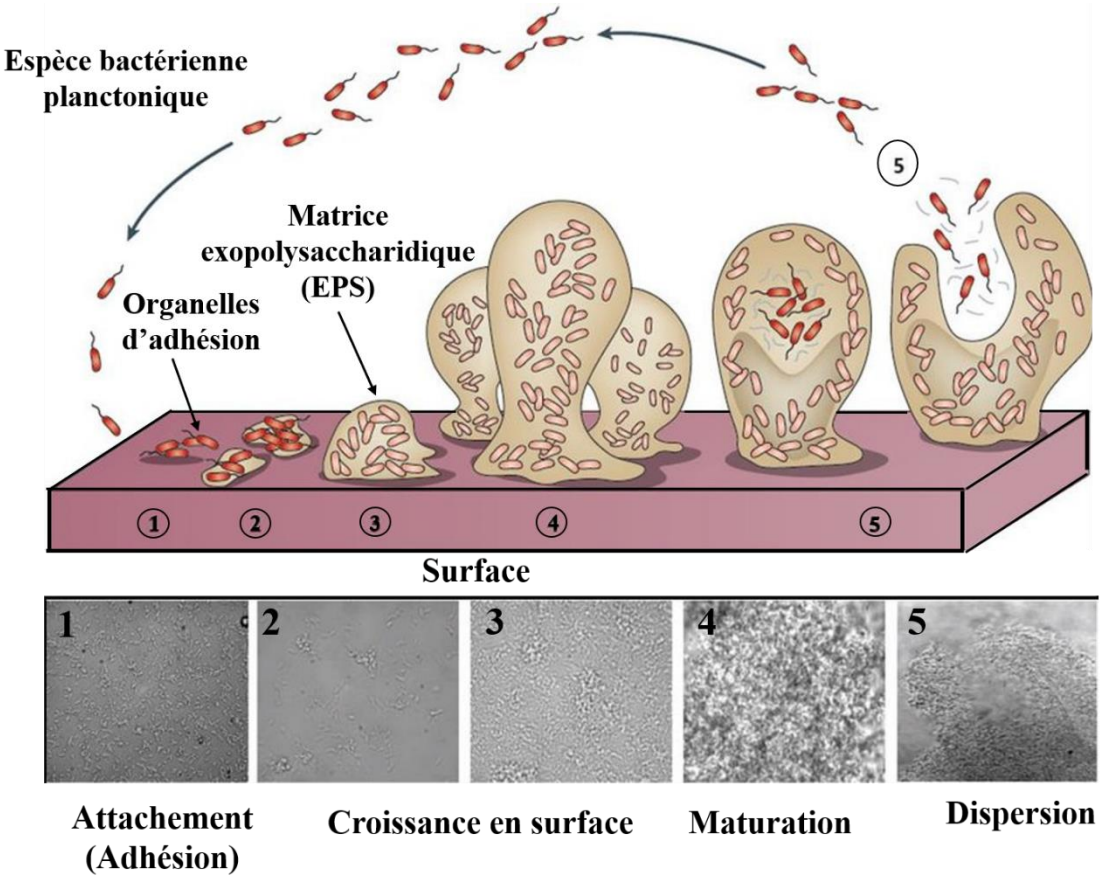


Figure 1. Étapes de la formation des biofilms (adapté de Davies, 2011).

5. Mécanismes d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles et leurs composants jouent un rôle clé en tant qu'agents antimicrobiens. En raison de leur nature hydrophobe, les HEs traversent de manière significative les lipides des membranes cellulaires des bactéries, perturbent les structures des parois cellulaires et les rendent plus perméables (Bhavaniramya et al., 2019). Ce changement de perméabilité de la membrane entraîne la fuite d'ions et d'autres matériaux cellulaires (Álvarez-Martínez et al., 2021), ce qui conduit à la mort de la cellule. Les HEs présentent à la fois des activités à cible unique et à cibles multiples. Par exemple, le trans-cinnamaldéhyde, l'un des principaux composés des HEs, est capable de contrôler la croissance d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimirium* en réduisant les niveaux d'ATP intracellulaire. Il accède également au périplasme et aux parties les plus profondes de la cellule. La carvone est un autre constituant important des HEs, qui perturbe les membranes externes des cellules mais n'affecte pas les réserves d'ATP cellulaires (Bhavaniramya et al., 2019).

Les activités antibactériennes des HEs sont fortement associées à la présence des principaux composés, à savoir, le citral, le carvacrol, l'eugénol et le thymol, qui appartiennent au groupe des phénols, et présentent une activité significative, suivis par les terpènes, notamment les monoterpènes oxygénés, et d'autres composés, notamment les cétones comme β-myrcène, α-thujone et acétate de géranyle (Boren et al., 2020).

Dans le cas des monoterpènes oxygénés, le cinéole présente des activités antimicrobiennes élevées contre une large gamme de bactéries (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*) (Angane et al., 2022; Singer et al., 2016). De plus, le carvacrol, le thymol et l'eugénol sont également connus pour leurs activités efficaces contre des micro-organismes en perturbant les membranes cellulaires, ce qui entraîne des altérations du flux d'électrons, de la force motrice des protons et du transport actif, ainsi que la coagulation du contenu cellulaire (Du et al., 2015) (figure 2). En outre, le carvacrol possède la capacité de perturber les fonctions vitales de la cellule en provoquant une chute du pH intracellulaire, qui se traduit par une perte des réserves d'ATP (Du et al., 2015).

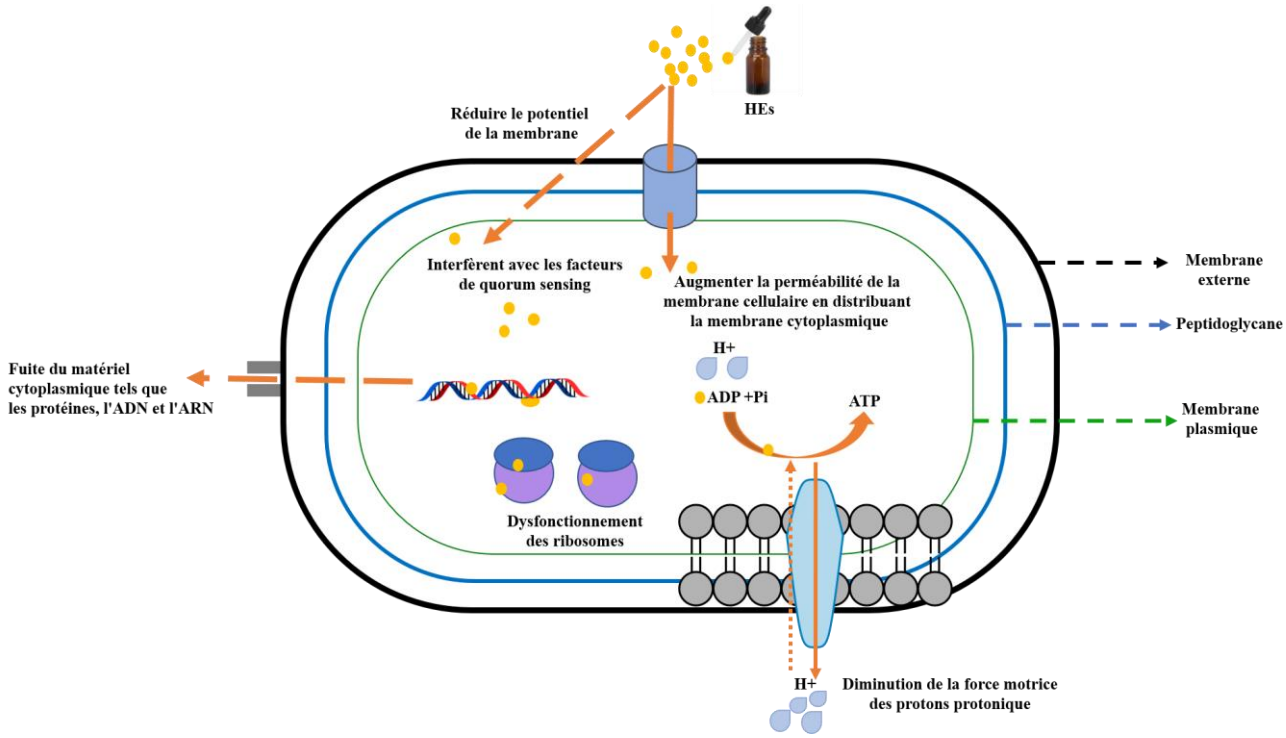


Figure 2. Mode d'action antibactérien des HEs (adapté de Bouyahya et al. 2017).

En général, les HEs sont plus actives chez les bactéries Gram-positives en raison de la présence de la couche de peptidoglycane, qui se trouve à l'extérieur de la membrane plasmique.

Cependant, chez les bactéries Gram-négatives, la membrane externe est composée d'une double couche de phospholipides consituées principalment par des lipopolysaccharides (LPS) (Angane et al., 2022; Burt, 2004). En effet, les LPS sont constitués de trois composants de base tels que le lipide A, un polysaccharide central et une chaîne latérale O, qui sont responsables de la résistance des bactéries Gram-négatives aux HEs (Abdellatif et al., 2022). La présence de canaux transmembranaires hydrophiles dans la membrane externe joue un rôle clé dans le transfert de petits solutés hydrophiles à travers les membranes externes. Les interactions des HEs avec la membrane externe limitent la diffusion des substances hydrophobes à travers son film lipopolysaccharidique (Alibi et al., 2020).

En outre, les propriétés des composés volatils présents dans les HEs et leurs interactions peuvent renforcer l'activité antibactérienne (Angane et al., 2022; Burt, 2004). Dans certains cas, la combinaison d'un ou de deux composés présente une activité plus importante que lorsqu'ils sont utilisés individuellement. De plus, des effets synergiques sont également observés entre les HEs lorsqu'elles sont utilisées en combinaison et plusieurs études ont rapporté que l'utilisation d'HEs entières montrerait une plus grande activité que celle des principaux composés utilisés en combinaison (Burt, 2004). Par exemple, l'activité combinée des composés volatils et des dérivés de l'acide benzoïque contre les micro-organismes tels que *Listeria monocytogenes* et *S. enteritidis* a montré des inhibitions plus importantes que la somme des effets inhibiteurs des composants individuels (Boren et al., 2020).

Les HEs extraites de *Syzygium aromaticum* et de *Rosmarinus officinalis* ont montré des effets antifongiques accrus contre *Candida albicans* lorsqu'elles étaient utilisées en combinaison (Déciga-Campos et al., 2021). Lambert et al. (2001) ont indiqué que la combinaison binaire (50%/50%) du carvacrol et du thymol présentait des activités supérieures contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Un autre rapport révèle les effets synergiques de l'utilisation combinée du cinnamaldéhyde avec le thymol ou le carvacrol contre *S. typhimirium*, mais les résultats ont montré deux hypothèses différentes. L'un des mécanismes suggère que la combinaison du cinnamaldéhyde avec le thymol ou le carvacrol pourrait avoir altéré la perméabilité de la membrane pour faciliter l'entrée dans la cellule. Un autre mécanisme suggère que cette combinaison pourrait avoir augmenté le nombre, la taille ou la durée d'existence des pores dans la membrane cellulaire en se liant aux protéines de la membrane cellulaire (Boren et al., 2020; Lambert et al., 2001)

IV. Effet antioxidant des huiles essentielles

1. Stress oxidatif

Les radicaux libres s'accumulent comme produits secondaires naturels des processus métaboliques, engendrant un stress oxydatif dans l'organisme (Akram et al., 2021; Pateiro et al., 2021). Ce stress peut également être causé par des facteurs externes tels que la pollution, la fumée de cigarette, les radiations et les médicaments, entraînant des dommages aux cellules. Le stress oxydatif, par définition, implique un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou des espèces réactives de l'azote (RNS) (Das and Roychoudhury, 2014). Il est à l'origine de processus dégénératifs tels que la peroxydation des lipides, la glycation/oxydation et la nitration des protéines, l'inactivation des enzymes et les dommages à l'ADN, qui sont associés à de nombreuses maladies non transmissibles telles que le diabète, le cancer, les troubles auto-immuns, les maladies liées au vieillissement, l'arthrite rhumatoïde, les atteintes cardiovasculaires et neurodégénératives (Aruoma, 1998) (figure 3). Toutefois, ce processus peut être régulé par des antioxydants produits par une voie naturelle in situ ou apportés de l'extérieur par des aliments et/ou des suppléments à base de plantes. Les antioxydants jouent un rôle essentiel en tant que piégeurs de radicaux libres ou d'espèces actives d'oxygène.

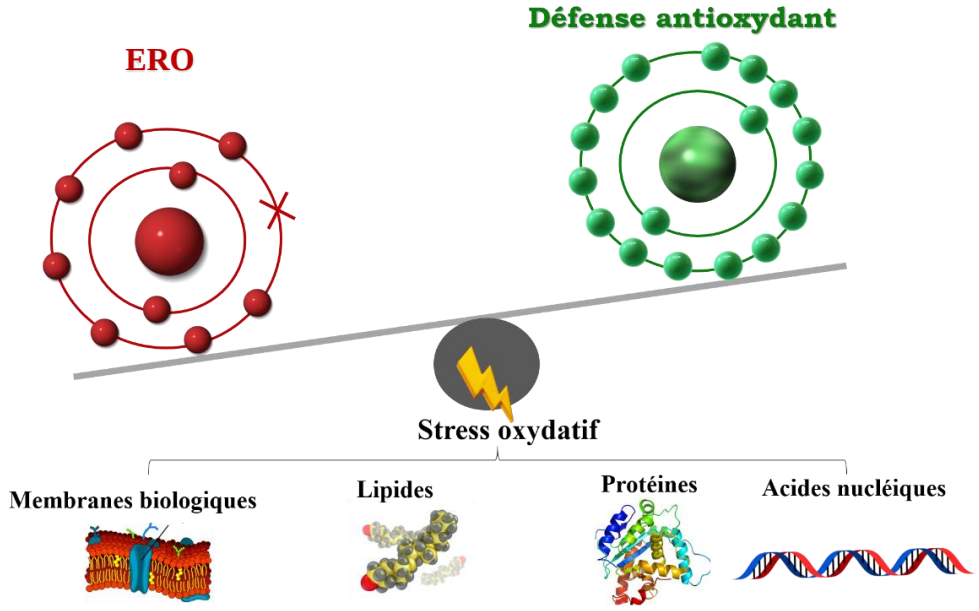


Figure 3. Schéma montrant le stress oxydant (élaboré par Jeddi mohamed).

2. Rôle de la défense antioxydante dans les organismes

La défense antioxydante peut être enzymatique ou non enzymatique.

Dans le système enzymatique primaire, les enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la DT-diaphorase constituent des éléments développés par les organismes aérobies. La SOD est responsable de la réaction de dismutation de l'O_2 en H_2O_2, qui, dans des réactions ultérieures, catalysées par la catalase ou par la GPx, produisent l'H_2O et de l'O_2 (Liu et al., 2018). Le système puissant d'enzymes de détoxification permet à la SOD de jouer un rôle vital dans la cellule. La SOD, en tant que métalloenzyme, a besoin d'un métal comme cofacteur pour être activée. Ainsi, les différentes formes d'enzymes dépendent du type d'ion métallique (Bhavaniramya et al., 2019).

Le fer ou le manganèse sont utilisés dans la CAT comme cofacteur et peuvent catalyser la réaction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour dégrader ou réduire l'eau et les produits de l'oxygène moléculaire. Cela permet d'achever le processus de détoxification entamé par la SOD (Liu et al., 2018). La CAT est présente dans les peroxysomes et dissocie de nombreuses molécules d'H_2O_2 en une seconde, et élimine l'H_2O_2 lors de l'oxydation des acides gras (Sharopov et al., 2020). La GPx, qui est une enzyme intracellulaire, décompose le H_2O_2 dans l'eau et les peroxydes lipidiques sur la base de leurs alcools dans les mitochondries et parfois dans le cytosol. Le sélénium est l'élément indispensable à l'activation de la GPx.

La fonction du système non enzymatique est de piéger les radicaux libres et de prévenir la mise en œuvre de la réaction d'initiation des radicaux. Ces derniers sont neutralisés ou capturés en présence d'électrons (Kıran et al., 2023). Le rôle des antioxydants tels que tocophérol, acide ascorbique, les carotènes, la ferritine, le sélénium, le glutathion réduit (GSH), le manganèse, l'ubiquinone, le zinc, les flavonoïdes, la mélatonine, la bilirubine, et la taurine est de contrôler ou de limiter les dommages causés aux cellules par les radicaux libres (Cecerska-Heryć et al., 2021; V Lobo et al., 2010). De plus, certains produits naturels contenant des flavonoïdes ont des interactions directes avec les ERO pour générer des composés complexes stables ou moins réactifs, tandis que d'autres flavonoïdes peuvent agir comme co-substrat dans le processus de catalyse de certaines enzymes (Cecerska-Heryć et al., 2021).

3. Activité anti-oxydante des huiles essentielles

Les huiles essentielles, considérées comme des antioxydants naturels, ont plusieurs mécanismes d'action pour ralentir les réactions d'oxydation. La prévention de l'initiation de la chaîne et le maintien de l'abstraction d'hydrogène, le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la formation d'oxygène singulet et la fixation des catalyseurs d'ions métalliques de transition font partie de leurs modes d'action (Pateiro et al., 2018).

Dans une étude réalisée par Kulisic et al. (2004), les propriétés antioxydantes de l'HE d'origan ont été déterminées à l'aide des tests de blanchiment du β-carotène (BCB), de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et des espèces réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS). Les HEs d'origan testées ont présenté un pouvoir antioxydant différent. Alors que l'HE d'origan a montré une faible activité de piégeage des radicaux par le test DPPH, Asensio et al. (2017) ont montré que les capacités antioxydantes des HEs de trois espèces d'origan provenant de différentes régions d'Argentine (*Origanum x majoricum*, *Origanum vulgare subsp. vulgare*, et *Origanum vulgare subsp. hirtum*) étudiées à l'aide de tests 2,2-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP), du blanchiment du β-carotène et de la capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC), présentent une différence selon l'origine géographique. Ce phénomène a également été signalé par plusieurs autres chercheurs. En plus de l'origine géographique de la plante, la période de récolte est un autre facteur susceptible d'affecter l'activité antioxydante (Nieto et al., 2018). Dans cette optique, Ozkan et al. (2019) ont révélé que les activités de piégeage des radicaux libres (IC_{50} = 116,74-132,93 µg/mL) et les capacités antioxydantes réductrices (23,54-31,02 mg d'équivalent d'acide ascorbique (AAE)/g d'HE) des HEs de graines d'*Origanum onites* L. différaient en fonction de la période de récolte. Dans la même étude, certains échantillons d'origan turc sélectionnés se sont également révélés être riches en composants antioxydants naturels potentiels, tels que l'acide rosmarinique. En outre, le carvacrol et le thymol ont également été signalés comme les principaux composants corrélés à l'activité antioxydante de l'HE d'origan (Nieto et al., 2018). Ces composants sont les principaux composés phénoliques présents non seulement dans l'HE d'origan, mais aussi dans l'HE des espèces de *Thymus*. Plusieurs espèces de *Thymus* se sont révélées riches en carvacrol et en thymol et ont démontré une activité antioxydante élevée, notamment *Thymus vulgaris* L. (Jeddi et al., 2023c), *Thymus capitatus* L. (Bouyahya et al., 2020) et *thymus satureioides* (El Hachlafi et al., 2021).

D'autre part, bien que les rapports de Ali et al. (2015) et de Zouari et al. (2011) indiquent que ces composants sont absents ou en faible quantité dans la composition de l'HE de *Thymus algeriensis* L. Boiss. et Reut, l'huile d'olive a été indiquée comme une source alternative d'antioxydants naturels. La partie de la plante d'où les HEs sont obtenues est un autre facteur important qui détermine leur composition chimique et leur activité antioxydante. Par exemple, différentes parties de la cannelle, telles que l'écorce, la feuille, la fleur et la racine, peuvent être utilisées pour obtenir son HE, entraînant ainsi des concentrations différentes de composants bioactifs et donc d'activités antioxydantes (Kıran et al., 2023). Il convient également de tenir compte du fait que différentes méthodes peuvent être appliquées pour obtenir les HEs. Deng et al. (2022) ont étudié l'impact de la méthode de distillation sur les caractéristiques anti-oxydantes de l'HE de *Citrus paradisi* Macf. (pamplemousse) pressée à froid, mesurées par les méthodes du DPPH (IC_{50} = 22,06 mg/mL) et ABTS (IC_{50} = 15,72 mg/mL). Les résultats indiquent que cette technologie pourrait être une bonne alternative pour obtenir des HEs avec des compositions appropriées et sans effet négatif sur l'activité antioxydante.

En outre, la composition chimique des HEs détermine leurs caractéristiques et donc leur mode d'action. Cependant, en raison de la grande variété de composés, leur activité antioxydante ne peut être attribuée à un seul mécanisme d'action (Burt, 2004). Cependant, pour faciliter l'exploration des effets antioxydants des huiles essentielles, certains chercheurs ont lié l'activité antioxydante des principaux composants à l'activité totale de l'huile essentielle (Wei and Shibamoto, 2010).

Les composés phénoliques sont parmi les composants prédominants de plusieurs HEs et peuvent constituer jusqu'à 85 % de la composition totale de certaines HEs. Le carvacrol, l'eugénol et le thymol sont parmi les composés phénoliques les plus connus (Bakkali et al., 2008). Ces composés peuvent être définis comme des antioxydants primaires ou des antioxydants à rupture de chaîne, et comme des piégeurs efficaces de radicaux libres (Pateiro et al., 2018). Leur activité en tant qu'antioxydants se déroule en trois phases : initiation, propagation et terminaison. Leurs groupes hydroxyles (-OH) forment généralement le site de transfert d'hydrogène, ce qui permet d'inactiver les radicaux libres (radicaux peroxyles et alkoxyles lipidiques) générés par l'oxydation des acides gras insaturés. Ces propriétés redox sont dues à leur capacité à donner un électron au radical libre, ce qui en fait des antioxydants efficaces, empêchant d'autres composés de s'oxyder (Nguyen et al., 2003).

Ces réactions conduisent à la formation de nouveaux radicaux incapables d'extraire des atomes d'hydrogène des lipides insaturés (Coma, 2012). Ces radicaux résultants peuvent réagir avec des radicaux similaires ou des radicaux lipidiques, donnant lieu à des espèces non radicalaires, des radicaux peroxyles inactivants (ROO-) et des réactions de terminaison (Jayasena et Jo, 2013). À cet égard, les composés phénoliques peuvent être utilisés pour prévenir l'oxydation des lipides, en agissant comme des inhibiteurs des réactions d'oxydation, et prévenir la détérioration des lipides.

V. Présentation des espèces étudiées

1. Description de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées, anciennement connue sous le nom de Labiées en raison de la corolle à deux lèvres de ses fleurs, constitue l'une des familles les plus vastes dans le règne végétal. Elle comprend environ 250 genres et 7 000 espèces, qui sont plus ou moins cosmopolites, mais notamment répandues du bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (Botineau, 2010; Bräuchler et al., 2010). Elle est divisée en sept sous familles : *Symphorematoideae, Nepetoideae, Scutellarioideae, Prostantheroideae, Ajugoideae, Viticoideae* et *Lamioideae* (Bräuchler et al., 2010).

Les lamiacées sont des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes, à feuilles opposées sans stipules et à tiges quadrangulaires (Harley et al., 2004; Khaled-Khodja et al., 2014). Les fleurs sont hermaphrodites ou mâles stériles, formant des verticilles souvent disposés en têtes, racèmes, épis ou cymes. Les corolles sont sympétales et typiquement bilabiées ; rarement, elles sont à une seule lèvre ou plus ou moins actinomorphes. Généralement, les calices sont à 2 lèvres et à 5 lobes ; et les étamines au nombre de 4 (rarement 2), avec la paire inférieure étant plus longue que la paire supérieure. L'ovaire est supérieur, doublement carpelle, mais semble aussi quadrilobé à maturité. Le fruit comprend 4 noix sèches avec une graine unique (Benabid, 2000; Harley et al., 2004).

Les plantes appartenant à la famille des lamiacées, riches en huiles essentielles, revêtent une grande importance dans divers domaines tels que la médecine naturelle, l'alimentation, les arômes, la parfumerie, la cosmétique, les industries pharmaceutiques et les pesticides. En raison de leur vaste éventail d'utilisations, les plantes de la famille des lamiacées sont largement cultivées et sont ainsi considérées comme une source incontournable d'aliments fonctionnels.

1.1 *Lavandula angustifolia* Mill

1.1.1 Taxonomie et description botanique

L. angustifolia est une plante aromatique, qui pousse naturellement au Maroc, appartenant à la famille des lamiacées, et connue sous le nom vernaculaire Khzâma (خُزَامَى) (El-Hilaly et al., 2003).

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous-classe: Asteridae
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Sous-famille : Nepetoideae
Genre : *Lavandula*
Espèce: *Lavandula angustifolia* Mill., 1768

Elle se présente sous la forme d'un sous arbrisseau de 20 à 80 cm de hauteur, doté d'une racine pivotante. Les tiges sont ligneuses mesurent 15 à 20 cm, et sont dépourvues de feuilles sous les inflorescences. Les pédoncules floraux sont courts et fins, et ne portent qu'un seul épi. Les feuilles sont linéaires-étroites et de couleur gris-vert, ont une longueur de 2 et 5 cm. Les Fleurs sont bleues groupées à l'aisselle de bractées ovales au sommet de rameaux fertiles formant des sortes d'épis de 6 à 10 groupes un peu lâches, très aromatiques (figure 4) (Aichaoui and Hanane, 2018; Guitton, 2010; Passalacqua et al., 2017).



Figure 4. Photographie originale de la partie aérienne de *Lavandula angustifolia* (Photo prise par Jeddi Mohamed)

1.1.2 Répartition géographique

L. angustifolia est répandue sur quatre continents, à savoir l'Asie, l'Afrique, l'Amérique et l'Europe. Elle se propage surtout en Afrique du Nord et dans le Sud de l'Europe, ainsi que sur le pourtour Méditerranéen. C'est une plante qui pousse à l'état sauvage dans des régions allant des îles de la Macaronésie jusqu'à la côte méditerranéenne et à l'Inde. Elle est largement cultivée en Australie, en Bulgarie, en Grèce, en Italie, en France, au Canada, aux États-Unis, ainsi que dans les pays d'Afrique du Nord. Au Maroc, *L. angustifolia* pousse dans les régions montagneuses et ensoleillées, notamment dans le Moyen et le Haut Atlas et dans le Nord du Maroc (Bachiri et al., 2015; Passalacqua et al., 2017).

1.2 *Lavandula burnatii* ou *Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loisel

1.2.1 Taxonomie et description botanique

L. burnatii, également connue sous le nom de lavandin, *Lavandula hybrida* ou lavande hollandaise, est un hybride stérile entre *Lavandula angustifolia* Mill et *Lavandula latifolia* Medik, donnant ainsi une plante à fleurs aromatique de la famille des Lamiacées (Bajalan et al., 2017).

Règne : Plantae	Famille : Lamiaceae
Division : Tracheophyta	Sous-famille : Nepetoideae
Classe : Magnoliopsida	Genre : *Lavandula*
Ordre : Lamiales	Hybrides : *Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loisel.,1828

L. burnatii est une plante vivace dotée de racines traçantes. La tige ligneuse est de couleur verte. Des épillets secondaires sont présents à la base de l'épi. La fleur a un pédoncule très court et poilu, la bractée est intermédiaire entre les 2 parents, triangulée plate, dissymétrique à deux dents. Les feuilles sont oblongues et linéaires (figure 5) (Garzoli et al., 2019). *L. burnatii* a 2 carpelles avec 4 loges libres. Le fruit est un tétrakène avorté, et la graine est également avortée. L'androcée est constitué de 5 étamines. Le calice possède 4 dents, le cinquième lobe postérieur se développe en un lobe pelté (Lesage-Meessen et al., 2015; Pokajewicz et al., 2023a).



Figure 5. Photographie originale de la partie aérienne de *Lavandula burnatii* (Photo prise par Jeddi Mohamed).

1.2.2 Répartition géographique

Lavandula est naturellement distribuée dans la région méditerranéenne, les îles Canaries et l'Inde. Certaines espèces peuvent pousser naturellement dans le Nord, l'Est et le Sud de l'Afrique ; ainsi qu'en Pologne, en Espagne, en Turquie, en Bulgarie, en France, en Russie, en Australie, en Angleterre et aux États-Unis (Détár et al., 2020). *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *L. latifolia* sont originaires du centre et du Sud-Ouest de l'Europe et proviennent du bassin méditerranéen (Bejar, 2020; Lis-Balchin, 2002). *L. angustifolia* pousse naturellement en France, en Italie et en Espagne dans les régions montagneuses entre 600 et 1200 m. C'est une espèce commune dans les endroits ensoleillés avec des sols calcaires bien drainés (Gallotte et al., 2020; Passalacqua et al., 2017).
L. latifolia se trouve dans la même région mais à une altitude de 300 à 800 m. Cette plante pousse généralement dans des forêts mixtes sur des sols calcaires (Gallotte et al., 2020; Herrera, 1988). *L. burnatii* apparaît dans des endroits où deux espèces parentales sont présentes simultanément (Espagne et France). Compte tenu des exigences des plantes mères en matière d'habitat, le lavandin peut être trouvé en plein soleil sur des sols secs, bien drainés, pierreux et calcaires (Gallotte et al., 2020). Les trois taxons de lavande sont largement cultivés dans le monde (Lis-Balchin, 2002; Pokajewicz et al., 2023b).

2. Description de la famille des Myrtacées

La famille des Myrtacées est la 8ème plus grande famille de plantes à fleurs en termes d'importance écologique et économique, comprenant plus de 3100 espèces réparties en 140 à 150 genres (Govaerts et al., 2008). Cette famille a son centre de diversité dans les régions tropicales, particulièrement en Amérique du Sud, en Australie et en Asie tropicale (Grattapaglia et al., 2012; Pereira et al., 2012). La classification APG III (2009) et les études récentes de Boulouaret and Boufroua, (2021) classent la famille des Myrtacées au sein des clades suivants : Eudicotylédones, Malvidae, Angiospermes, Rosidae et Myrtales. Les études de révision phylogénétique suggèrent 2 sous-familles, Psiloxyloideae et Myrtoideae avec 17 tribus au sein de la famille des Myrtacées (Lucas et al., 2019). Les Myrtacées représentent un modèle de choix pour l'investigation de l'évolution chez les Angiospermes, car les genres se distinguent par un grand nombre d'espèces. Par exemple, le genre Eucalyptus compte environ 700 espèces, Eugenia comprend environ 1050 espèces et Syzygium contient entre 1200 et 1500 espèces (Brooker, 2000; Wilson, 2010).

2.1 *Eucalyptus polybractea* R. T. Baker

2.1.1 Taxonomie et description botanique

E. polybractea, l'eucalyptus à fleurs multiples, est un arbre de la famille des Myrtaceae originaire d'Australie (King et al., 2006).

Règne : Plantae	Ordre : Myrtales
Division : Magnoliophyta	Famille : Myrtaceae
Classe : Magnoliopsida	Genre : *Eucalyptus*
Sous-classe: Rosidae	Espèce: *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker, 1901

E. polybractea est un arbre qui atteint généralement une hauteur de 8 à 10 m et forme un lignotubercule. L'écorce de la partie inférieure du tronc est rugueuse, fibreuse ou floconneuse, de couleur grisâtre à brunâtre, tandis que l'écorce supérieure est lisse, de couleur grisâtre à brunâtre, et se détache en rubans (Akhtar et al., 2011; Nicolle, 2013). Les jeunes plantes et les repousses de taillis ont des feuilles bleutées à glauques, linéaires à lancéolées, de 4 à 15 cm de long et de 0,3 à 1,6 cm de large. Les feuilles adultes sont de la même nuance de vert bleuté sur les deux faces, en forme de lance, de 6 à 17 cm de long et de 0,4 à 2 cm de large, se rétrécissant en un pétiole de 0,4 à 1,5 cm de long (Akhtar et al., 2011; Harden, 1990).

Les bourgeons floraux sont disposés à l'aisselle des feuilles en groupes de 7, 9 ou 11 sur un pédoncule non ramifié de 0,4 à 1,2 cm de long ; et les bourgeons individuels sur des pédicelles pouvant atteindre 0,4 cm de long. Les bourgeons matures sont en forme de massue ou de losange, de 0,4 à 0,8 cm de long et de 0,3 à 0,4 cm de large, avec un opercule conique à arrondi (Harden, 1990; Nicolle, 2013). La floraison a lieu principalement de mars à août et les fleurs sont de couleur blanche. Le fruit est une capsule ligneuse, en forme de tonneau ou de coupe, de 0,4 à 0,7 cm de long et de 0,3 à 0,5 cm de large, dont les valves sont proches du niveau du bord (Davis, 2002; Nicolle, 2013) (figure 6).



Figure 6. Photographie originale de la partie aérienne d'*Eucalyptus polybractea* (Photo prise par Jeddi Mohamed).

2.1.2 Répartition géographique

Le genre *Eucalyptus* est originaire de Tasmanie, en Australie. Il s'est bien adapté dans d'autres parties du monde, notamment en Amérique du Sud, en Afrique et en Europe (Akhtar et al., 2011; Tolba, 2017).

3. Description de la famille des Astéracées

La famille des Astéracées, également appelée Composées, constitue une importante famille de plantes dicotylédones, comprenant 1 530 genres et plus de 23 000 espèces (Elisa, 2018). Elle regroupe des plantes herbacées, des lianes, des arbres, des arbustes, des plantes aquatiques et des plantes succulentes (Bremer and Anderberg, 1994). Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, sans pédoncules, situées à l'extrémité d'une tige ou d'un rameau et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus, qui favorise la dispersion des graines par le vent (Botineau, 2010; Ozenda, 1992).

Un grand nombre de composées (Astéracées) sont ornementales (zinnias, chrysanthèmes, dahlias), certaines fournissent des légumes (topinambour, laitue, artichaut, chicorée), d'autres des insecticides (pyrèthre), alors que d'autres encore sont des plantes médicinales (armoise, arnica, camomille).

3.1 *Ormenis mixta* (L.) Dumort

3.1.1 Taxonomie et description botanique

Ormenis mixta (L.) Dumort. (Synonymes : *Cladanthus mixtus* (L.) Chevall., *Anthemis mixta* (L.), *Chamaemelum mixtum* (L.) All., *Ormenis multicaulis* Braun-Blanq. & Maire), également connue sous le nom de camomille sauvage du Maroc, est une plante méditerranéenne très répandue au Maroc, appartenant à la famille des Astéracées (El Mihyaoui et al., 2023).

Règne : Plantae	Ordre : Asterales
Division : Magnoliophyta	Famille : Asteraceae
Classe : Magnoliopsida	Genre : *Ormenis*
Sous-classe: Asteridae	Espèce: *Ormenis mixta* (L.) Dumort.

O. mixta est une composée chaméphyte bisannuelle présentant de nombreuses tiges longues dressées, mesurant de 10 à 40 cm, terminées par des capitules à ligules blanches (figure 7). Ses capitules, dont les fleurs en languette sont blanches et jaunes à la base, se développent de Juin à Septembre (Aafi et al., 2005; El Hafidi et al., 2023). Les feuilles, généralement dentées ou entières, sont légèrement épaisses et se terminent en pointe. L'involucre est constitué de bractées largement membraneuses, restant attachées sous le capitule fructifère (Darriet et al., 2012; Nègre, 1962).

Les fleurs de la partie centrale s'étendent à la base en une sorte de coiffe qui couvre le sommet de l'ovaire ; cette coiffe se prolonge d'un coté en un appendice. Les bractées sont ovales-allongées, aiguës et velues à leur extrémité. Cette plante est distinguée par un parfum fraîche balsamique (Harras and Lamarti, 2014; Lahsissene et al., 2009).



Figure 7. Photographie originale de la partie aérienne d'*Ormenis mixta* (Photo prise par Jeddi Mohamed).

3.2.2 Répartition géographique

O. mixta est une plante aromatique endémique, distribuée principalement entre l'ouest septentrional du Maroc (Maâmora, Rabat et Salé) et la partie septentrionale du centre du Maroc, incluant les régions d'Agouraï et de Meknès (Benkhaira et al., 2021). Elle se rencontre en général dans les forêts, les champs, les pâturages pierreux et sablonneux, ainsi que dans les basses montagnes (Harras and Lamarti, 2014).

La camomille sauvage du Maroc est une sialophyte qui prolifère dans les espaces des bioclimats sub-humide et semi-aride, sur les sols sableux de l'étage thermoméditerranéen. Elle se trouve dans deux zones distinctes : la première s'étend entre Ouezzane, Tanger, Azilah, Moulay Bousselham et Souk Larbaa ; la seconde entre Sidi Slimane, Kénitra, Rabat et Khémisset (El Hafidi et al., 2023).

Le tableau 1 présente l'état des connaissances actuelles concernant les activités biologiques et l'activité antioxydante des HEs d' *E. polybractea*, *O. mixta, L. burnatii* et *L. angustifolia*.

Tableau 1. Activités biologiques et l'activité antioxydante des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et *L. angustifolia*.

Activités	*E. polybractea*	*O. mixta*	*L. burnatii*	*L. angustifolia*
Activité antibactérienne	Forte action contre les bactéries pathogènes (*Acinetobacter baumannii Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Staphylococcus aureus et epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) (Aldoghaim et al., 2018; Sharma et al., 2022).	Efficacité de l'HE et de l'extrait méthanolique contre *S. aureus, Enterococcus faecalis, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, E. coli, P. aeruginosa, Salmonella typhi* (Elouaddari et al., 2019b).	Pouvoir inhibiteur important de l'huile sur les bactéries pathogènes (*E. coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, P. aeruginosa, S. enteritidis, B. cereus, S. aureus Enterococcus faecalis* (Blažeković et al., 2018; Pljevljakusic et al., 2023).	Forte action inhibitrice contre les bactéries pathogènes (*E. coli, S. aureus, A. baumannii, S. thyphi,* et *Enterobacter cloacae*) (Radi et al., 2022).
Activité antifongique	Activité antifongique importante contre *Trichoderma viride*, *Penicillium sp*2, *Fusarium graminearum* et *Aspergillus flavu* (Chibi and Hassaine, 2023).	Pouvoir antifongique significatif contre *Trametes pini*, *Aspergillus niger* et *Penicillium parasiticus* (Satrani et al., 2007).	Activité antifongique contre les champignons filamenteux (*Fusarium oxysporum, Aspergillus fumigatus, A. niger* et) et les levures (*Candida tropicalis* et *Candida glabrata*) (Blažeković et al., 2018).	Activité antifongique contre *C. tropicalis, Candida auris* et *C. albicans* (Walasek-Janusz et al., 2022).
Activité antioxydante	Forte activité anti-radicalaire contre le radical DPPH (Sharma et al., 2022).	Capacité de piégeage des radicaux libres de l'HE avec une CI_{50} de 0,59 ± 0,11 mg/mL (Ouedrhiri et al., 2018).	Forte action contre les radicaux DPPH et ABTS (Pljevljakusic et al., 2023).	Forte action contre les radicaux DPPH et ABTS, ainsi qu'un pouvoir réducteur significatif des ions ferriques (Jeddi et al., 2023a; Kıvrak, 2018).

Activité anti-inflammatoire	Entraîne une inhibition de la dénaturation des protéines induite par la chaleur (Sharma et al., 2022).	Effet inhibiteur sur l'œdème de la patte causé par la carragénine (Hajjaj et al., 2016).	Diminue l'expression de l'ARNm, de l'interféron γ (IFN- γ), de l'interleukine 22, de l'iNOS et du MIP-2α, réduisant ainsi l'inflammation (Baker et al., 2012; Pokajewicz et al., 2023b).	Effet inhibiteur sur l'œdème de la patte causé par la carragénine (Hajhashemi et al., 2003).
Activité antidiabétique	Activité inhibitrice contre les enzymes α-glucosidase et α-amylase (Maurya et al., 2023; Usman et al., 2022).	Non reporté	- Non reporté	- Activité inhibitrice contre les enzymes α-glucosidase et α-amylase (Jeddi et al., 2023a; Najibullah et al., 2021).
Activité anticancéreuse	Effet cytotoxique très forte sur le lymphome de Burkitt (Raji) (Bardaweel et al., 2014).	Activité anti-cancéreuse importante contre les cellules de carcinome mammaire humain (MCF-7) et de carcinome prostatique humain (PC-3) (El Mihyaoui et al., 2022).	Activité cytotoxique très forte sur la lignée cellulaire MCF-7 (cancer du sein humain) (Tabatabaei et al., 2018).	Activité anti-cancéreuse importante contre les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (cancer du sein) (Aboalhaija et al., 2022).
Activité insecticide	Forte toxicité contre les adultes de *Tribolium castaneum* (dose létale (DL_{50}) = 10 µl/L) après 72 h d'exposition (Chibi and Hassaine, 2023).	Non reporté	- Forte toxicité contre les larves (DL_{50}= 59,7 µL/L), les nymphes (DL_{50}=37,3 µL/L) et les adultes (DL_{50}=81 µL/L) de *Tribolium confusum* (Pokajewicz et al., 2023b; Theou et al., 2013).	Forte toxicité contre les larves de *Culex pipiens* et les nymphes d'*Ixodes ricinus* (Abdel-Baki et al., 2023; El-Akhal et al., 2021; Pirali-Kheirabadi and da Silva, 2010).

Partie II : Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

1. Récolte du matériel végétal

En se basant sur l'enquête ethnobotanique effectuée par notre équipe de recherche dans la région de Taounate (Mernissa, Nord du Maroc) au cours des années 2019 et 2020 (Jeddi et al., 2021), et après une recherche bibliographique approfondie, quatre plantes médicinales ont été sélectionnées, à savoir *Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta*, *Lavandula burnatii* et *Lavandula angustifolia*. Ces plantes ont été choisies en raison de leur disponibilité, de leur accessibilité, et surtout du fait qu'elles sont encore moins exploitées et étudiées.

Les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) d'*Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta, Lavandula burnatii* et de *lavandula angustifolia* ont été récoltées dans la commune de Thar Es-Souk (province de Taounate, Nord du Maroc) au cours des mois de Avril et Juin 2021. Les quatre plantes étudiées ont été collectées et distillées pendant la période de floraison et de post-floraison, car c'est la meilleure période pour exploiter les principes actifs des plantes (Jeddi et al., 2023b; Zrira et al., 2003). L'identification botanique des espèces a été effectuée par une botaniste, le Professeur Amina Bari, du Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc. Un échantillon de chaque plante a été déposé à l'herbier du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et Molécules Bioactives, Faculté des Sciences et Techniques de Fès, sous les spécimens de référence BLMUP 386-389. Les noms des plantes examinées, leurs familles, les parties extraites, ainsi que les régions et les périodes de leur récolte sont répertoriés dans le tableau 2.

Les parties recueillies ont été coupées et séchées pendant deux semaines à l'ombre, dans un endroit aéré et à température ambiante, afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules. Après séchage, le matériel végétal a été stocké dans des sacs propres et fermés, à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière, jusqu'au moment de l'extraction.

Tableau 2. Plantes aromatiques et médicinales étudiées.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Famille	Partie utilisée	Période de récolte	Région de récolte
***Eucalyptus polybractea* R.T. Baker.**	Kalitos	Myrtacées	Feuilles et fleurs	Mai - Juin 2021	Tahar-souk (province de Taounate, Nord du Maroc) (34° 39′ 03″ N, 4° 16′ 40″ O)
***Ormenis mixta* (L.) Dumort.**	Elhallala	Astéracées	Partie aérienne	Avril 2021	
***Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (*Lavandula burnatii*)**	Khozama	Lamiacées	Partie aérienne	Mai-Juin 2021	
***Lavandula angustifolia* Mill.**	Khozama	Lamiacées	Partie aérienne	Mai-Juin 2021	

2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs a été réalisée par la société ‘’BIOPAM’’ relevant de la commune de Thar Es-Souk à la province de Taounate. Les parties aériennes séchées (feuilles, tiges, fleurs) de chaque plante ont été soumises à une extraction par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928) (figure 8). Au cours de chaque expérience, 250 g de matière végétale est mise en ébullition (100°C) dans 1 litre d'eau distillée pendant 2 heures et 30 minutes. La vapeur d'eau chargée de molécules volatiles (HE) se condense en traversant le réfrigérant et se sépare en deux phases : une phase organique, qui constitue l'HE, et une phase aqueuse, constituant l'hydrolat qui a été éliminée. La distillation a été répliqué trois fois (n = 3) pour chaque échantillon afin de récupérer un volume suffisant pour l'étude biologique. Les huiles extraites ont été déshydratées en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer les résidus et les traces d'eau, et conservées à 4 °C à l'abri de la lumière dans des flacons en verre teinté, fermés hermétiquement pour les protéger de la lumière, de l'air et des variations de température, qui sont les principaux agents d'altération des HEs (Bajpai et al., 2008; Djibo, 2000).

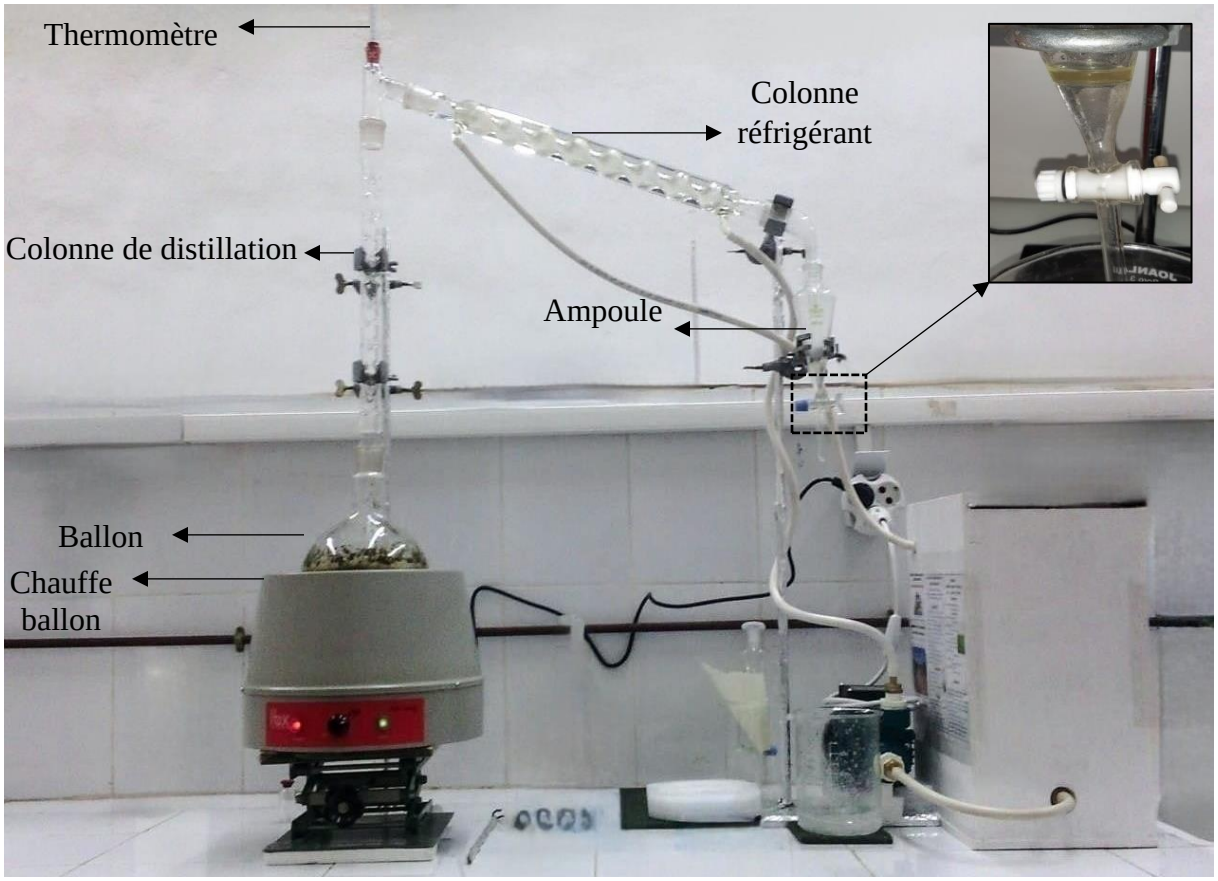


Figure 8. Montage expérimental de l'hydrodistillation (type Clevenger). (Société BIOPAM).

3. Détermination du rendement d'extraction en huile essentielle

Le rendement en HE (R^{dt}) est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue après distillation (M_{HE}) et la masse de la matière végétale sèche utilisée (M_V), exprimées dans la même unité de masse. Le rendement en HE, sont exprimés en pourcentage (%), est calculé par la formule suivante (Afnor, 2000).

$$R^{dt}(\%) = \frac{\text{Masse d'huile essentielle (g)}}{\text{Masse du matériel végétal sèche utilisé (g)}} \times 100$$

II. Analyse phytochimique par Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

Les composants chimiques des huiles essentielles étudiées ont été identifiés à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse de type Hewlett Packard (série HP 6890) couplée à la spectrométrie de masse (série HP 5973). La fragmentation a été réalisée via une intensité d'impact électronique de 70 eV. Une colonne capillaire non polaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film de 0,25 µm) a été utilisée pour la caractérisation chromatographique. La température de la colonne est programmée de 50 à 200°C pendant 5 min à raison d'une montée de 4°C/min. Le gaz vecteur de chromatographie était de l'hélium (He) avec un débit de 1,5 mL/min. Un volume d'échantillon de 0,5 µL (dilués dans le méthanol 10%) a été injecté en mode split à une température de 220°C. En outre, les spectres de masse (MS) ont été identifiée par ionisation électronique (IE) à une tension d'ionisation de 70 eV, une température de la source d'ionisation de 200°C et une gamme de balayage spectral de 40-450 m/z. L'appareil était piloté par un système de gestion informatique de type "HP Chem Station", gérant son fonctionnement et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques (El Ajjouri et al., 2008).

L'identification des composants phytochimiques des HEs a été basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (SM) et de leurs indices de Kovats (IK) détectés par rapport à une série homologue de n-alcanes C8-C24, avec ceux enregistrés dans des bases de données telles que NIST, et WILEY (Adams, 2017, 2001).

III. Etude de l'activité antimicrobienne des HEs

1. Souches microbiennes cibles

Les souches microbiennes utilisées pour évaluer la capacité antimicrobienne sont sélectionnées en fonction de leur potentiel de pathogénicité et sont reconnues pour leur forte antibiorésistance. Il s'agit de deux bactéries à Gram négatif (Gram -), à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ainsi que deux bactéries à Gram positif (Gram +), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Bacillus cereus,* en plus d'une levure, *Candida albicans*. Ces souches font partie de la collection du laboratoire de Biotechnologie Microbienne et de Molécules bioactives (LBM2B), de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès (tableau 3).

2. Caractéristiques des souches bactériennes et fongiques étudiées

2.1 Souches bactériennes testées

2.1.1 *Escherichia coli (E. coli)*

Les souches d*'E. coli*, sont des bacilles à Gram- appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ces bactéries, commensales du tube digestif, constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie. Elle représente l'espèce principale associée aux infections communautaires chez l'adulte, et notamment dans les infections urinaires chez la femme (Fabre et al., 2010). La sensibilité de cette bactérie est en constante évolution, et sa résistance aux antibiotiques conventionnels, en particulier à la combinaison acide clavulanique /amoxicilline (amoxiclav), ne cesse d'augmenter ; en plus d'une rare émergence d'espèces porteuses de β-lactamases à spectre étendu (Leone, 2003).

2.1.2 *Staphylococcus aureus (S. aureus)*

S. aureus est un Cocci à $Gram^+$, immobiles, ubiquitaire, commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste. *S. aureus* est également responsable d'intoxications alimentaires et d'infections nosocomiales, et sa résistance aux antibiotiques constitue parfois un problème majeur dans le traitement des patients (Botton et al., 1990; Dumitrescu et al., 2010).

2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*

P. aeruginosa est un bacille à $Gram^-$ de la famille des Pseudomonadaceae, mobile grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche), dépourvu de capsules et de spores. C'est un germe ubiquitaire, vivant dans les endroits humides et les sols, et très résistant à de nombreux antiseptiques. Il est fréquent dans les hôpitaux, et représente l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement ; ce qui entraîne l'émergence (en raison de sa résistance aux antibiotiques) de plus en plus fréquente d'infections nosocomiales (Cabot et al., 2011; Stover et al., 2000).

2.1.4 *Bacillus cereus (B. cereus)*

B. cereus est une bactérie, en forme de bâtonnet, à $Gram^+$, aérobie ou anaérobie facultative, mobile, encapsulée, pathogène et opportuniste, capable de produire des endospores résistantes en présence d'oxygène. Elle est largement répandue dans l'environnement, notamment dans le sol, où les spores persistent dans des conditions défavorables. Bien que principalement associée aux intoxications alimentaires, elle est de plus en plus signalée comme une cause d'infections non gastro-intestinales,

graves dont des infections oculaires, et potentiellement mortelles comme des pneumonies et des méningites (Bottone, 2010; Buckley and Grotticelli, 2022).

2.2 Souche fongique testée : *Candida albicans* (*C. albicans*)

C. albicans est une levure non pigmentée, non capsulée, aérobie et diploïde, dont le matériel génétique est réparti en 8 chromosomes (Chu et al., 1993). Elle se reproduit de manière asexuée par bourgeonnements multilatéraux à partir d'une cellule mère (Gräser et al., 1996), formant des colonies blanches crémeuses. Elle s'agit d'un saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté (chez la femme) (Abedini, 2013). L'infection par *C. albicans* est considérée comme l'un des risques les plus graves pour la santé publique dans le monde (Yu et al., 2019). *C. albicans* est bien reconnu pour être un agent pathogène virulent qui peut causer diverses maladies telles que la colite, la pneumonie, la chéilite angulaire et la candidose cutanée (Salvatori et al., 2016).

Tableau 3. Quelques caractéristiques des souches microbiennes étudiées.

Souches testées	Caractéristiques		
	Type	**Mobilité**	**Milieux d'isolement**
E. coli	Bacilles à Gram-	Mobile (flagelles péritriches)	Gélose éosine au bleu de méthylène (EMB)
S. aureus	Cocci à Gram +	Immobile	Gélose Baird-Parker
P. aeruginosa	Bacille à Gram-	Mobile (ciliature polaire monotriche)	Gélose au cétrimide
B. cereus	Bacille à Gram +	Mobile (ciliature péritriche)	Gélose au lait /Mossel
C. albicans	Levure	Mobile	Gélose à l'extrait de levure – peptone - glucose (YPG)

3. Conservation des souches

À partir de cultures fraîches de souches microbiennes préalablement préparées et ensemencées sur une gélose nutritive, quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une anse stérile, puis inoculées dans un bouillon nutritif. Après incubation à une température et une durée appropriée pour chaque souche microbienne ; 0,5 mL de l'inoculum (Milieu de culture + germe) est mélangé avec 0,5 mL de glycérol stérile (40%) dans des tubes Eppendorfs, puis conservé à (-20 °C). Cette méthode garantit une conservation à long terme. Toutefois, pour un stockage à court terme, les souches microbiennes ont été conservées sur un milieu gélosé incliné à (4 °C). Avant utilisation, les souches étudiées ont été réactivées par deux sous-cultures dans un milieu de culture adéquat, pendant une durée adaptée à chaque micro-organisme (tableau 4).

4. Milieux de culture

Les milieux de culture et les conditions d'incubation, adaptés aux différents microorganismes étudiés, sont répertoriés dans le tableau 4.

Tableau 4. Milieux de culture et conditions d'incubation en fonction des microorganismes étudiés.

Microorganismes	Milieux de culture (repiquage)	Criblage d'activité antibactérienne	Détermination CMI	Conditions de culture
Bactéries	Milieu Luria Bertani (LB)	Gélose de Muller Hinton (MH)	Bouillon MH supplémenté de 0,17 % d'agar	37°C pendant 24h
Levures	Milieu yeast peptone glucose (YPG)	Gélose de yeast peptone glucose (YPG)	Bouillon de (YPG) supplémenté de 0,17 % d'agar	30°C pendant 48h

5. Préparation des micro-organismes (culture fraiche)

Dans des conditions aseptiques, à partir d'un stock de souches microbiennes conservées dans du glycérol à -20 ou sur gélose inclinée à 4°C, on effectue un ensemencement à l'aide d'une anse stérile sur une boîte de Petri contenant une gélose nutritive pour les bactéries, et YPG pour les levures, préalablement autoclavés (4bar /121°C/15 min) et pré-incubés pendant 24 h à 25°C (Levures) et à 37°C (bactéries).

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

Le standard 0,5 McFarland est utilisé pour normaliser le nombre approximatif de bactéries dans une suspension liquide en comparant la turbidité de la suspension testée à celle du standard McFarland. Elle est préparée comme suit : 0,05 mL de la solution ($BaCl_2$, 0,048 moL/L) sont ajoutée à 9,95 mL de (H_2SO_4, 0,18 moL/L). La densité optique (DO) de 0,08 à 0,10 correspond à 0,5 McFarland à une longueur d'onde (λ) de 625 nm (CLSI, 2012).

7. Préparation d'inoculum

7.1 Bactéries

La concentration finale de l'inoculum varie en fonction du test à réaliser. En effet, une concentration de 10^8 UFC/mL a été employée pour le test de diffusion sur disque d'agar, tandis qu'une concentration de 10^6 UFC/mL a été utilisée pour l'évaluation des CMIs des huiles individuelles, par la technique de microdilution, ainsi que pour les essais de formulation. De ce fait, dans des conditions aseptiques et à partir d'une culture jeune de 24h, quelques colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, puis émulsionnées dans un tube contenant 5 mL d'eau physiologique stérile (NaCl à 0,9 %). La turbidité de la suspension bactérienne après homogénéisation au vortex doit être équivalente au standard McFarland 0,5 (~10^8 UFC/mL). Finalement, pour préparer 5 mL d'inoculum bactérien à une concentration de 10^6 UFC/mL, 0,05 mL de l'inoculum préalablement préparé (~10^8 UFC/mL) a été ajouté à 4,95 mL de milieu liquide MHB supplémenté de 0,17% d'agar (figure 9).

7.2 Levures

De manière similaire, deux inocula sont préparés pour la souche de *Candida* étudiée. Le premier, équivalent à 10^6 UFC/mL, a été employé pour le test de diffusion sur disque d'agar, tandis que le second, équivalent à 10^3 UFC/ml, a été utilisé pour évaluer les CMIs des huiles seules, ainsi que pour les essais de formulation (figure 9).

8. Diffusion sur disque d'agar

Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des HEs testées a été effectué d'abord à l'aide de la méthode de diffusion sur disque décrite par NCCLS, 1999, en raison de sa simplicité et de son efficacité pour évaluer la sensibilité des souches microbiennes. Cette méthode repose sur la capacité des HEs à migrer à travers la gélose à l'intérieur de la boîte de Petri, ce qui permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des micro-organismes testés (Figure 10).

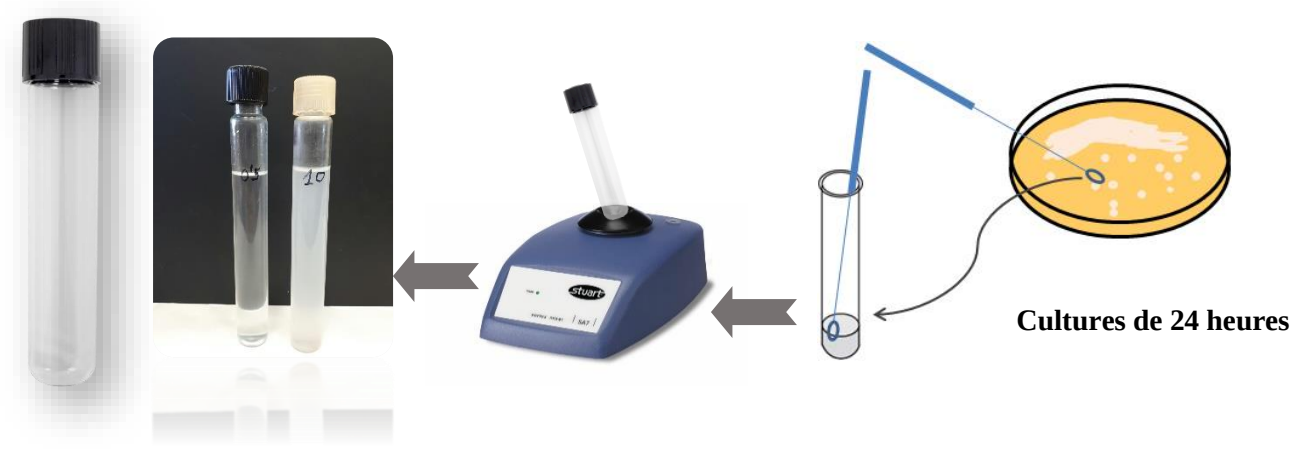


Figure 9. Etapes de préparation des suspensions microbiennes.

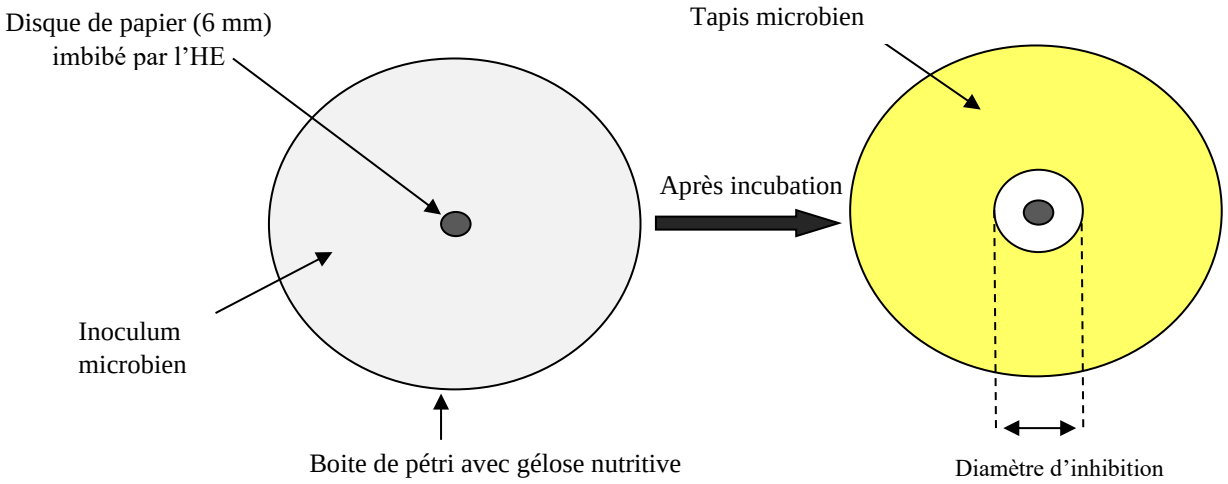


Figure 10. Schéma descriptif de la méthode de diffusion sur disque d'agar.

Dans des conditions aseptiques, des boites de pétri (90 mm de diamètre), contenant 20 mL de milieu gélosé en surfusion (Yeast Peptone Glucose pour *C. albicans* et Mueller Hinton pour les bactéries), ont été ensemencées par écouvillonnage à partir de suspensions microbiennes, dont la turbidité a été ajustée à 10^8 UFC/ml pour les bactéries, et à 10^6 UFC/ml pour *C. albicans* (Al-Mijalli et al., 2023b). Ensuite, des disques de papier-filtre stériles (6 mm), imprégnés séparément de 10 µl de l'HE, ont été déposé à la surface du milieu gélosé pré-inoculé. Les boites ont été maintenues à 4ºC pendant 1 h pour que les HEs puissent diffuser, avant que les microorganismes commencent à se multiplier (El Hachlafi et al., 2023c).

La kanamycine et la gentamicine ont été utilisées comme des contrôles positifs pour les bactéries, tandis que le Fluconazole a été utilisé comme référence pour *C. albicans*. Toutes les boites ont été incubées pendant 20 h à 37 ºC pour les bactéries et 48 h à 30 ºC pour *C. albicans*. Après l'incubation, les halos d'inhibition ont ensuite été mesurés et exprimés en millimètres (mm) (figure 10). La sensibilité des souches microbiennes aux HEs est appréciée en fonction du diamètre des zones d'inhibition comme suite (Ponce et al., 2003; Moreira et al., 2005):

- (+ + +) souche extrêmement sensible (D >20 mm).
- (+ +) souche très sensible (15 mm ≤ D ≤ 19 mm) ;
- (+) souche sensible (8 mm ≤ D ≤ 14mm) ;
- (-) souche non sensible (6 ≤ D < 8 mm);

9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des quatre HEs étudiées ont été évaluées à l'aide de la méthode de micro-dilution en milieu liquide, en utilisant des microplaques de 96 puits (Al-Mijalli et al., 2023b; CLSI, 2012) (figure 11). La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'HE qui génère une inhibition complète de la croissance visible à l'œil nu du micro-organisme testé après l'incubation. L'agar bactériologique à 0,17 % (p/v) a été utilisé comme émulsifiant des HEs dans le milieu de culture. Tout d'abord, une plaque de microtitration de 96 puits a été remplie de 50 µL de bouillon approprié (MH, YPG) complété par de l'Agar à 0,17 % (p/v). En outre, un volume de 100 µL de chaque échantillon (huile), à une concentration finale de 8 % (v/v) a été ajouté dans le 1er puits. Ensuite, des micro-dilutions en série ont été effectuées en pipettant 50 µL du 1er puits et en les transférant dans le puits suivant. Cette procédure a été répétée jusqu'au 11ème puits, et le dernier mélange de 50 µL a été jeté. Le 12^{éme} puits a été considéré comme témoin de la croissance microbienne.

Enfin, 50 µL de la suspension microbienne préalablement préparée ont été déposés dans chaque puits. Les concentrations finales des HEs variaient entre 8% et 0,007 % (v/v). Les microplaques ont été incubées durant 24 h à 37°C pour les bactéries et 48 h à 25 °C pour *C. albicans*. Le milieu de culture (0,17% d'agar) sans suspension microbienne a été utilisé comme contrôle de croissance (12^{éme} puits). La kanamycine et la gentamicine ont été utilisées comme des contrôles positifs pour les bactéries, tandis que le Fluconazole a été utilisé comme référence pour *C. albicans*.

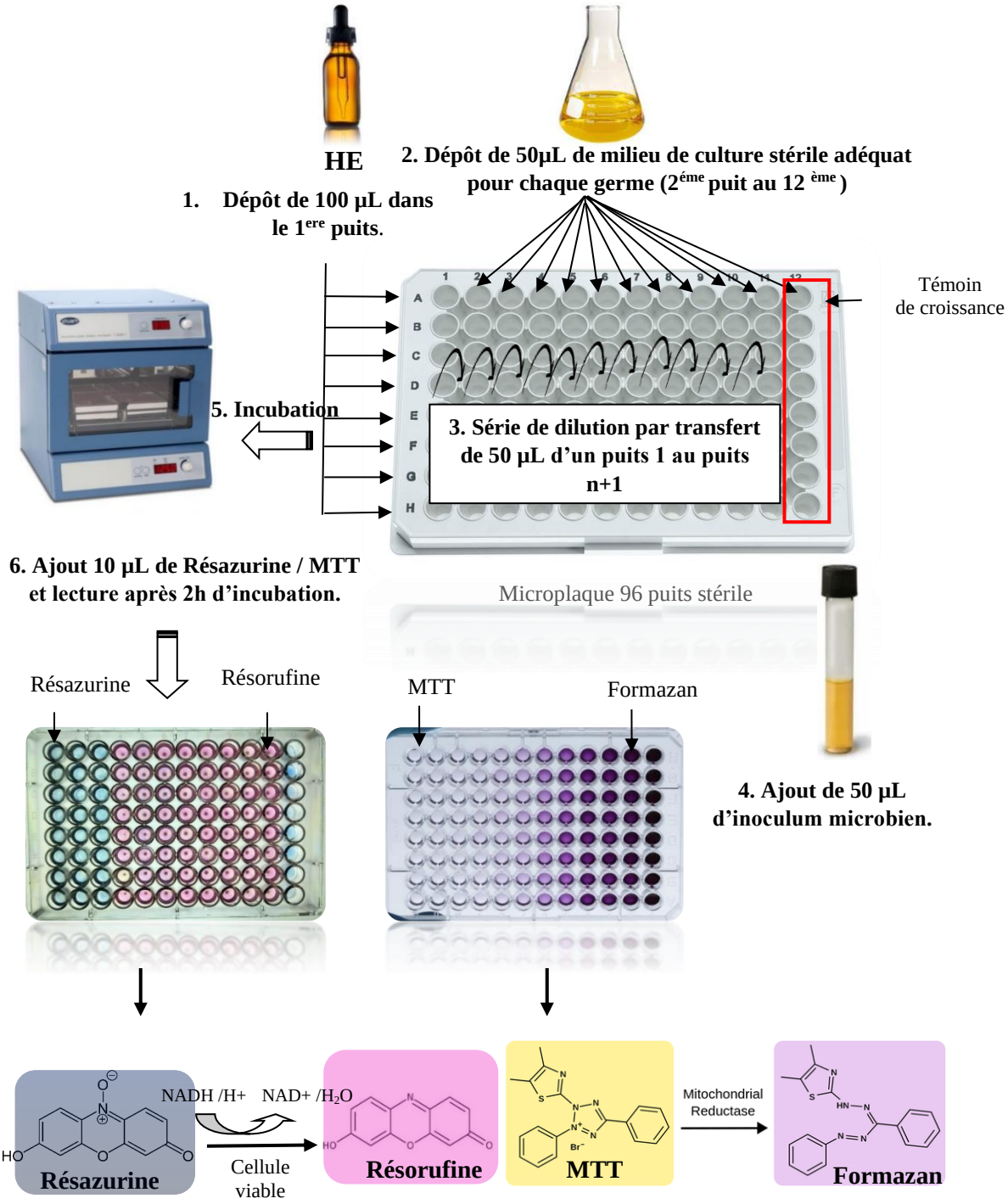


Figure 11. Schéma descriptif de la méthode déterminant la CMI (Adoptée par Mohamed Jeddi).

Après incubation des microplaques, la croissance des micro-organismes a été révélée par l'apparition d'une tache blanche au fond des puits, et pour confirmation, 10 µl de résazurine ou de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) a été ajouté à chaque puits. Après une nouvelle incubation à 37 °C pendant 2 h, la croissance microbienne a été confirmée par le changement de couleur observé au niveau des puits. La CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration d'HE qui empêche le changement de couleur du MTT ou de la résazurine.

10. Concentration minimale Fongicide (CMF) / Bactéricide (CMB)

La concentration minimale fongicide (CMF) et celle bactéricide (CMB) correspondent à la plus faible concentration de l'HE testée, capable de tuer plus de 99,99% de l'inoculum microbien initial. Les valeurs de CMF et CMB ont été déterminées en inoculant 5 µl de puits n'ayant montré aucune croissance microbienne lors du test CMI, dans des boites contenant du milieu de culture LB pour les bactéries et YPG pour la levure. Ensuite, les boites ont été incubées dans des conditions appropriées pour chaque germe (Mrabti et al., 2023). Après la période d'incubation, les boites ont été examinées pour évaluer la croissance microbienne. Le CMF ou CMB a été déterminé comme étant la concentration à laquelle aucune colonie microbienne ne s'est développée sur les boites de milieu de gélose (Al-Mijalli et al., 2022).

11. Détermination des rapports CMF/CMI et CMB/CMI

Les rapports CMF/CMI et CMB/CMI ont été calculés afin d'identifier le mode d'action potentiel des quatre HEs examinées (El Hachlafi et al., 2023a; Ghavam, 2023) (tableau 5).

Tableau 5. Effets bactériostatiques /fongistatiques et bactéricides/fongicides des HEs.

CMB/CMI ou CMF/CMI	Effet
≤ 4	Bactéricide /Fongicide
>4	Bactériostatique/Fongistatique
≥ 32	Souche tolérante

IV. Optimization de l'activité antimicrobienne : Méthode de Damier

1. Matériel végétal

Les quatre HEs étudiées pour évaluer les activités antimicrobiennes, à savoir : les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii et* de *L. angustifolia* ont été sélectionnées afin d'optimiser leurs effets antimicrobiens en mélanges binaires. Les quatre plantes ont été récoltées, au cours des mois de Mars et Avril 2022, dans la commune de Thar Es-souk (province de Taounate, Nord du Maroc).

2. Cultures microbiennes

Afin de diversifier l'impact des combinaisons binaires des HEs étudiées sur les micro-organismes, trois souches différentes ont été choisis pour ce test, à savoir une bactérie à Gram positif (*S. aureus*), une autre à Gram négatif (*E. coli*), ainsi qu'une souche fongique (*C. albicans*).

3. Activité antimicrobienne : détermination de la Concentration Inhibitrice Fractionnaire (CIF)

Les activités antimicrobiennes des combinaisons binaires des HEs d'*E. polybractea,* d'*O. mixta,* de *L. burnatii* et de *L. angustifolia* contre *E. coli, S. aureus* et *C. albicans* ont été évaluées à l'aide de la méthode de Damier (Chackerboard) (Basri et al., 2012; Ouedrhiri et al., 2017) (figure 12). Chacune des deux HEs a été préparée dans un milieu de culture supplémenté de 0,15 % (p/v) d'agar adéquat pour chaque souche. Le long de l'axe x à travers la microplaque, 50 µL de la concentration d'HE la moins active, correspondant à la valeur de CMI la plus élevée (déterminée par le test de micro-dilution), ont été ajoutés dans chaque puits, du 1er au 11ème puits. En ce qui concerne l'axe des ordonnées (A-E), 50 µl de chaque concentration d'HE la plus active, correspondant à la valeur de CMI la plus faible (déterminée par le test de micro-dilution), ont été ajoutés dans chaque puits. Le 12ème puits (12-A) a été considéré comme témoin de croissance. Ensuite, 100 µL de l'inoculum microbien à une concentration finale de 2 ×10^3 UFC/ml pour *C. tropicalis*, et de 2 ×10^6 UFC/mL pour *E. coli* et *S. aureus*, ont été ajoutés dans tous les micro-puits. La microplaque a ensuite été scellée et incubée. Après 18-20 h d'incubation à 37 °C, 5 µl de résazurine ont été injectés dans chaque micro-puits pour évaluer la croissance microbienne. Après une nouvelle incubation à 37°C pendant 90 minutes, la croissance microbienne a été détectée par la réduction de la resazurine (violet) en résorufine (rose). Les expériences ont été réalisées en triplicata (n = 3). Les valeurs de l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICIF) ont été déterminées en additionnant les CIF séparés pour chacune des deux HEs.

Celles-ci ont été calculées comme le rapport entre la CMI de la combinaison des deux HEs et la CMI de l'HE individuelle en utilisant la formule suivante (Konaté et al., 2012) :

$$\sum \text{ICIF} = \text{CIF (A)} + \text{CIF(B)}$$

Où:

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

Et

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

Les valeurs de $\sum$ ICIF ont été interprétées comme suit : $\leq$ 0,5= synergie; 0,5-0,75 = synergie partielle ; 0,76-1,0 =additif ; >1,0-4,0 = indifférent (non-interactif) ; > 4,0 = antagoniste (Sadiki et al., 2014).

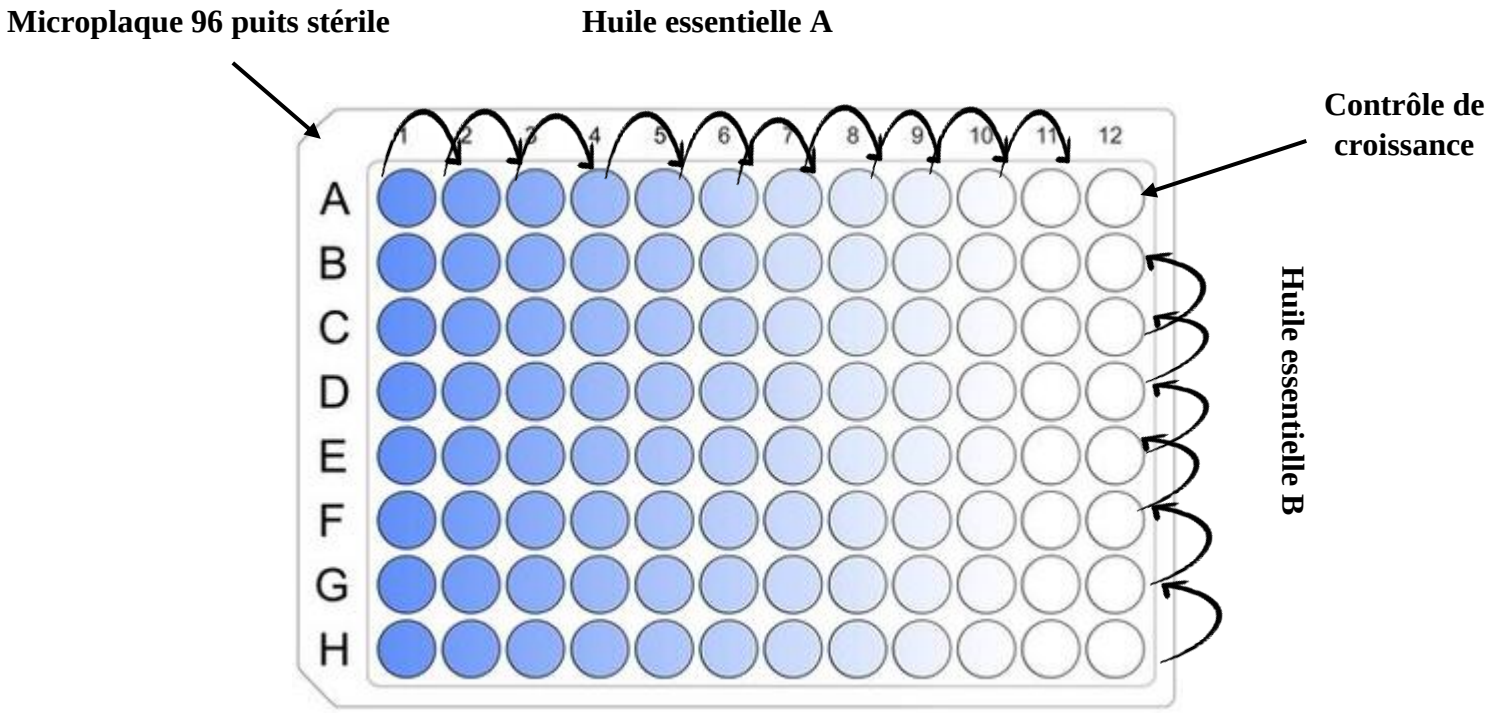


Figure 12. Schéma descriptif de la méthode déterminant l'indice de CIF.

4. Combinaisons binaires

Afin d'améliorer et de potentialiser l'effet d'interaction antimicrobienne entre les quatre HEs étudiées, divers mélanges binaires ont été testés à l'aide de la méthode de Damier, suivie de la détermination de l'ICIF. Le tableau 6 répertorie les différentes combinaisons testées sur chaque souche microbienne.

Tableau 6. Différentes combinaisons des huiles essentielles.

	Huile essentielle N°1	**Huile essentielle N°2**
Mélange N°1	*E. polybractea*	*O. mixta*
Mélange N°2	*E. polybractea*	*L. angustifolia*
Mélange N°3	*E. polybractea*	*L. burnatii*
Mélange N°4	*O. mixta*	*L. angustifolia*
Mélange N°5	*O. mixta*	*L. burnatii*
Mélange N°6	*L. angustifolia*	*L. burnatii*

V. Optimization de l'activité antimicrobienne par application du plan d'expèrience

1. Matériel végétal

En se basant sur les résultats des CMIs et de l'activité antimicrobienne des mélanges binaires des quatre plantes étudiées, leurs rendements d'extraction, ainsi que leur famille et leur origine ; et après une recherche bibliographique approfondie, trois plantes à savoir *E. polybractea*, *O. Mixta* et *L. burnatii*, ont été choisies pour optimiser leurs activités antimicrobiennes.

2. Cultures microbiennes

Afin de diversifier l'impact des combinaisons sur les micro-organismes, trois souches différentes ont été choisis pour ce test, à savoir une bactérie à Gram positif (*S. aureus*), une autre à Gram négatif (*E. coli*), ainsi qu'une souche fongique (*C. albicans*).

3. Plan de mélange et analyse statistique

3.1 Identification des facteurs et réponses

Les facteurs sont des grandeurs supposées avoir un effet sur les variations de la réponse. Ils représentent une proportion de chaque HE dans le mélange et peuvent prendre n'importe quelle valeur entre 0 et 1, de telle sorte que la somme des trois proportions est toujours égale à 1 (tableau 7). Il s'agit donc d'un mélange sans contraintes (Kachkoul et al., 2021).

De plus, les réponses ont été l'effet antimicrobien contre *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* évalué par la méthode de microdilution (tableau 8) comme mentionné précédemment.

Tableau 7. Identification des facteurs étudiées.

Constituant	Variables codées	Niveau Min	Niveau Max
EPHE	E1	0	1
OMHE	E2	0	1
LBHE	E3	0	1
Somme des proportions		1	

Avec :
EPHE: HE d'*E. polybractea*,
OMHE: HE d'*O. Mixta*
LBHE: HE de *L. burnatii*

Tableau 8. Identification des réponses étudiées.

Activités évaluées	Réponse mesurée	Unité de mesure
Activité antibactérienne	CMI	% (v/v)
Activité antifongique		

3.2 Plan de mélange utilisé et matrice d'expériences

La conception simplex-centroïde (*Augmented Simplex-centroid design*) à trois constituantes a été adopté comme plan d'expérience pour évaluer et optimiser les propriétés antimicrobiennes combinées des HEs testées (Al-Mijalli et al., 2023b; Goupy and Creighton, 2007). Cette conception comprenait 10 essais et était illustré sous la forme d'un triangle équilatéral (figure 13).

Les sommets du triangle ($E_1 - E_2 - E_3$) représentent trois HEs purs, les milieux des trois côtés sont constitués des combinaisons binaires (E_4 - E_5 - E_6), un mélange équi-proportionnel des HEs correspond aux centroïdes du triangle (point central) (E_7), et trois points augmentés (E_8 - E_9- E_{10}) sont alloués au mélange ternaire. L'expérience des mélanges à proportions égales (E_7) a été triplée pour déterminer l'erreur pure et la comparer au manque d'adéquation. En fin de compte, 12 expériences ont été utilisées dans le plan exploratoire actuel.

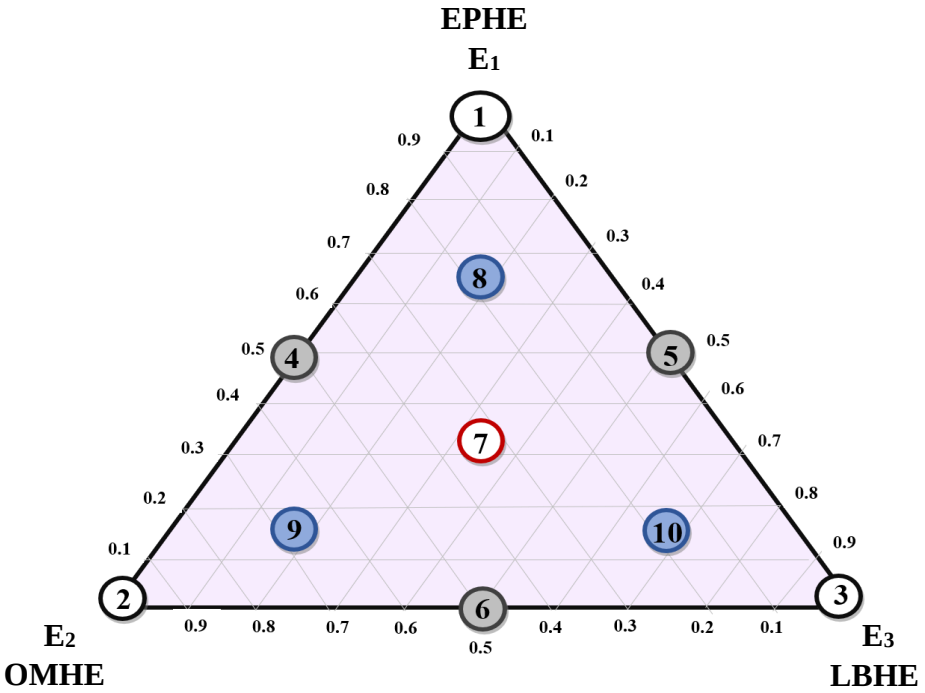


Figure 13. Positions des points expérimentaux pour le plan Simplex-centroïde augmenté (Goupy and Creighton, 2007).

Les facteurs (E_1, E_2 et E_3) sont des grandeurs présumées influencer les variations de réponse, représentant la proportion de chaque composant expérimental dans le mélange. Leurs valeurs peuvent varier de 0 à 1 sans contraintes sur l'espace de conception (Chraibi et al., 2023), avec :

E_1 : La proportion de l'HE d'*E. polybractea,* E_2 : La proportion de l'HE d'*O. mixta*, E_3 : La proportion de l'HE de *L. burnatii.*

Le tableau 9 indique la proportion de chaque constituant dans chaque combinaison.

Cette méthodologie de conception expérimentale a été utilisée pour trouver la formulation optimale tout en minimisant le nombre d'essais. Elle permet de déterminer la relation entre les variables et les réponses expérimentales mesurées. Dans notre étude, l'optimisation vise à trouver les constituants de la formulation optimale des HEs présentant la meilleure activité antimicrobienne.

Tableau 9. Matrice d'expérience générée.

Nombre d'expériences	EPHE (E_1)	OMHE (E2)	LBHE (E3)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,333	0,333	0,333
8	0,333	0,333	0,333
9	0,333	0,333	0,333
10	0,667	0,167	0,167
11	0,167	0,667	0,167
12	0,167	0,167	0,667

EPHE: HE d'*E. polybractea,* OMHE: HE d'*O. mixta*, LBHE: HE de *L. burnatii.*

4. Préparation des mélanges

Chaque formule a été émulsifiée à l'aide d'un milieu de culture supplémenté de 0,17 % d'agar approprié pour chaque souche microbienne testée. Ensuite, la proportion de chaque HE, indiquée dans le tableau (9), a été incorporée au bouillon, puis homogénéisée au vortex (Chraibi et al., 2021).

5. CMIs des mélanges

À partir de la solution mère de chacune des 10 formulations, une série de dilutions a été préparée pour un volume final de 50 µL. Ensuite, 50 µL de la suspension microbienne préparée et ajustée à 0,5 McFarland (10^8 CFU/mL) pour *E. coli* et *S. aureus*, et de 10^3 UFC/mL pour *C. albicans* ont été déposés aux diverses concentrations des séries de dilution.

Après incubation dans des conditions appropriées, 5µL de résazurine ont été injectés dans chaque micro-puits pour déterminer la croissance microbienne. Après une nouvelle incubation à 37 °C pendant 2h, la croissance microbienne a été confirmée par un changement de coloration du violet au rose. L'expérience a été répliqué 3 fois pour chaque combinaison (Benkhaira et al., 2023; Jeddi et al., 2023b).

6. Modèle mathématique

Le modèle mathématique choisi est un modèle spécial cubique utilisé pour représenter les réponses en fonction des variables indépendantes. Il s'agit d'un modèle linéaire avec interaction du troisième ordre comme exprimé dans l'équation suivante (Eq. (1)) (Fadil et al., 2018). Le choix de ce modèle a été effectué sur la base des valeurs de R^2 et $R^2_{\text{ajusté}}$, en comparant ces deux paramètres pour les modèles linéaire, quadratique et spécial cubique. Une comparaison de ces paramètres a été réalisée afin de choisir le meilleur modèle à utiliser. Des valeurs élevées de R^2 et $R^2_{\text{ajusté}}$ indiquent la meilleure qualité de prédiction (Aouan et al., 2023a).

$$Y = \delta_1 E_1 + \delta_2 E_2 + \delta_3 E_3 + \delta_{12} E_1 E_2 + \delta_{13} E_1 E_3 + \delta_{23} E_2 E_3 + \delta_{123} E_1 E_2 E_3 + \varepsilon \qquad (1)$$

Avec :

Y est la réponse de la CMI en % (v/v).

δ_1, δ_2, δ_3 : Coefficients des termes linéaires.

δ_{12}, δ_{23}, δ_{23} : Coefficients des termes binaires.

δ_{123} : Coefficient du terme ternaire.

ε : Le terme d'erreur.

7. Analyse statistique

Le test ANOVA a été appliqué pour vérifier la signification des modèles ajustés. À cette fin, nous avons calculé le rapport $F_{\text{ratio (R/r)}}$ entre le carré moyen dû à la régression (CM_R) et le carré moyen résiduel (CM_r) (Fadil et al., 2018; Hassan et al., 2020). La valeur F explique de manière appropriée la variation des résultats autour de leur moyenne et détermine également si l'effet principal est significatif (Box et al., 1978; Myers et al., 2016). En outre, le calcul du $F_{\text{ratio (MA/EP)}}$ a été effectué avec : CM_{MA} comme le carré moyen dû au manque d'ajustement et CM_{EP} comme le carré moyen dû à l'erreur pure.

Le $F_{\text{ratio (MA/EP)}}$ a été utilisé pour évaluer si le modèle mathématique postulé était bien ajusté aux résultats observés. Des valeurs élevées du $F_{\text{ratio (MA/EP)}}$ suggèrent un manque d'ajustement du modèle (Aouan et al., 2023b; Benkhaira et al., 2023). De plus, les coefficients de détermination R^2, R^2 ajusté ont été utilisés pour exprimer la qualité des modèles mathématiques postulés, tandis que le test *t*-student a été appliqué pour déterminer la signification statistique des coefficients du modèle estimé.

Les coefficients du modèle sont considérés statistiquement significatifs pour des valeurs de *p-value* inférieures à 0,05 (Al-Mijalli et al., 2023b; Mahmud et al., 2023). Les logiciels Design Expert version 12 et SAS JMP® version 14 ont été utilisés dans la conception du plan expérimental, ainsi que dans l'analyse statistique et graphique.

Les outils d'optimisation fournis par les logiciels, y compris les traces 2D et 3D basés sur des courbes d'iso-réponse, ont été utilisés pour identifier la formulation optimale menant à la réponse requise. Ces courbes permettent de rechercher avec précision les intervalles de modification des facteurs afin d'obtenir la réponse souhaitée (Fadil et al., 2018; Soussi et al., 2022). Ensuite, le test de désirabilité a été appliqué pour identifier précisément la réponse souhaitée en fonction des conditions optimales. Ce test permet de trouver un réglage optimal précis avec un pourcentage de compris entre 0 et 1 (Candioti et al., 2014; Jeddi et al., 2023b).

VI. Effet anti-adhésion

1. Préparation du matériau

La résine acrylique est largement utilisée dans la fabrication des prothèses dentaires. Ces résines sont des matériaux synthétiques macromoléculaires qui font partie de la vaste famille des matières plastiques. Les résines acryliques sont disponibles sous forme de poudre et de liquide. Elles peuvent être classées selon la méthode de polymérisation du méthacrylate de méthyle, que ce soit par chauffage, utilisation d'un agent chimique, modification de la concentration ou exposition à des radiations (Salman, 2018; Tronet and Pinet-Dessein, 2009). Dans cette étude, la résine acrylique réf 21551/V de 1 cm de côté a été utilisé. Le poly méthyl méthacrylate (PMMA) constitue la base chimique fondamentale de ce matériau. Les coupons en résine acrylique ont été soumis à l'érosion à l'aide de papiers en carbure de silicium de 100 à 1500 grains. Les coupons ont ensuite été stérilisés par trempage dans une solution d'éthanol (95 %) pendant 10 min et rincés trois fois avec de l'eau distillée, et enfin séchés à l'air.

2. Souches bactérienne testées

Dans le but d'analyser comment les HEs étudiées et leurs mélanges optimaux affectent le biofilm formé par les souches bactériennes sur la résine acrylique, deux types de bactéries ont été choisies: *S. aureus*, une bactérie à Gram positif, et *E. coli*, une bactérie à Gram négatif.

3. Traitement de la résine acrylique

L'effet des HEs et de leurs formulations optimales sur les paramètres physicochimiques des coupons en résine acrylique a été estimé après avoir déterminé les valeurs de CMI de chaque échantillon. La méthode de microdilution a permis d'obtenir les CMI suivantes : 0,25 % (v/v) pour les HEs *d'E. polybractea,* et *L. burnatii*, et 0,25 % (v/v) pour l'HE d'*O. mixta* contre *S. aureus*, tandis que 2, 6 et 1 % (v/v) étaient les CMIs pour les trois HEs *d'E. polybractea, L. burnatii*, et d'*O. mixta* contre *E. coli*, respectivement. Selon les résultats du plan d'expérience, nous avons déterminé les CMIs des mélanges optimaux des HEs contre *E. coli* (mélange optimal 1) et *S. aureus* (mélange optimal 2), qui sont respectivement de 0,37 et 0,11 % (v/v). D'après les données du plan d'expérience, les mélange optimaux 1 et 2 correspondait à 32%/28%/40%, 35%/30%/35%, des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, respectivement. Ensuite, un volume de 8 µL de chaque échantillon a été placé sur la surface des coupons pendant 10 minutes (Zouine et al., 2022). Après adsorption des HEs, les mesures d'angles de contact ont été effectuées.

4. Mesures de l'angle de contact

Les propriétés physicochimiques de la surface résine acrylique et les bactéries *S. aureus* et *E. coli* ont été mesurées à l'aide d'un goniomètre (GBX instruments, France) par la méthode de la goutte sessile (Van Oss, 1995). Les angles de contact ont été mesurés à 25 ± 1 °C en utilisant l'eau, le formamide et le diiodométhane comme liquides de référence avec des caractéristiques énergétiques connues (tableau 10). Une goutte de 2 µL du liquide testé a été distribuée sur la surface du matériau et les angles de contact ont été mesurés 15 secondes après la stabilisation de la goutte. Les tests ont été menés en trois mesures indépendantes.

Tableau 10. Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact.

Liquide	γ^{LW} (mJ/m^2)	γ^{+} (mJ/m^2)	γ^{-} (mJ/m^2)
Eau	21,8	25,5	25,5
Formamide	39	2,3	39,6
Diiodométhane	50,5	0	0

Composant Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}), le donneur d'électrons (γ^{-}) et l'accepteur d'électrons (γ^{+}).

5. Mesures de l'énergie libre de surface et de l'hydrophobicité

Après la mesure des angles de contact, l'équation de Young-Dupré a été utilisée pour déterminer le paramètres physico-chimiques à savoir les composants donneur d'électrons -, l'accepteur d'électrons + et l'énergie libre du composant de Lifshitz-van der Waals (γLW, γ- et γ+).

$$\gamma l\,(1\ +\ \cos\theta) = 2.[(\gamma s\ \mathrm{LW}.\ \gamma l\ \mathrm{LW})\ 1/2]\ +\ 2.[(\gamma s +.\ \gamma l -)\ 1/2]\ +\ 2.[(\gamma s\ -\ .\ \gamma l +)\ 1/2]$$

Avec :

L et S désignent respectivement les phases liquides et la surface solide, tandis que θ correspond à l'angle de contact. L'énergie libre de la surface (γs) est exprimée par l'équation suivante :

$$\gamma S\ = \gamma S\ \mathrm{LW} + \gamma S\ \mathrm{AB}$$

Où le paramètre de l'acide-base de Lewis est égal à :

$$(\gamma S\ \mathrm{AB})\ =\ 2(\gamma S - \gamma S +)1/2$$

A partir des valeurs de l'angle de contact avec l'eau (θw), l'hydrophobie de la surface du matériau de la résine acrylique a été évaluée qualitativement (Oliveira et al., 2001). Lorsque θw est inférieur à 65°, la surface du matériau (résine acrylique) est considérée comme hydrophile et lorsque θw est supérieur à 65°, elle est considérée comme hydrophobe. L'hydrophobie quantitative de la surface a été calculée selon la méthode de Van Oss (Lekbach et al., 2018). Dans cette approche, le matériau est considéré comme hydrophile lorsque ΔGiwi est positif, et hydrophobe lorsqu'il est négatif, où ΔGiwi est l'énergie libre d'interaction entre deux entités 'i' de ce matériau lorsqu'il est immergé dans l'eau. ΔGiwi est calculé à l'aide de l'équation suivante, qui inclut les composantes de la tension superficielle de l'eau et des entités en interaction :

$$\Delta\mathrm{Giwi}\ =\ -2\ [\ ((\gamma i\ \mathrm{LW})1/2\ -\ (\gamma w\ \mathrm{LW})1/2\ \ )2\ \ +\ 2((\gamma i\ +\ \gamma i -)\ ½\ +\ (\gamma w\ +\ \gamma w -)\ ½\ -\ (\gamma i\ +\ \gamma w -)\ ½) - (\gamma w\ +\ \gamma i -)\ ½)]$$

6. Évaluation de l'adhésion

Les cultures bactériennes ont été préalablement préparées en milieu LB pendant une nuit à 30 °C, puis elles ont été séparées à travers une centrifugation de 15 minutes à 5000 rpm. Après centrifugation, les cultures ont été lavé 2 fois avec solution stérile de nitrate de potassium (KNO_3) 0,1 M (Oliveira et al., 2001).

La densité optique de la suspension bactérienne a été ajustée à 0,4 (λ= 600 nm). Les coupons en résine acrylique ont été placés dans 10 mL de la suspension bactérienne préparée (Zouine et al., 2022). Le contrôle contenait des coupons stériles dans une solution de KNO_3 0,1 M uniquement.

7. Expérience d'anti-adhésion

Les coupons préalablement préparés ont été placés en incubation pendant 10 heures à une température de 25 °C. Ensuite, les échantillons ont été lavés avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) puis déshydratés en utilisant des concentrations d'éthanol croissantes (de 5% à 100%) pendant 10 minutes afin d'éliminer les cellules non adhérentes.

8. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le fonctionnement du microscope électronique à balayage (MEB) repose sur l'exploration de la surface des échantillons à l'aide d'un faisceau d'électrons à haute tension, émis par une source appelée canon, de manière synchronisée et focalisée sur un plan spécifique par rapport à l'échantillon à travers des lentilles électromagnétiques (objectifs).

Cette méthode engendre plusieurs interactions entre les électrons et la matière, provoquant l'émission de particules secondaires réfléchies de la surface des échantillons. Des détecteurs disposés dans la chambre sous vide capturent ces signaux secondaires, ce qui permet au système de visualisation d'images de créer des modèles en trois dimensions de la structure des échantillons. Cette approche d'analyse par MEB offre un avantage significatif en permettant l'étude des échantillons sans nécessiter de préparation préalable, préservant ainsi leur état naturel (Zouine et al., 2022).

VII. Activité antioxydante des HEs

1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH

Le pouvoir antioxydant des HEs étudiées a été évalué à l'aide du radical libre synthétique 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH) (Benkhaira et al., 2022). Brièvement, un volume de 100 µl d'HE à diverses concentrations, dissoute dans le méthanol, ont été additionnés à 750 µl d'une solution méthanolique de 0,004 % de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement, et après 25 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances ont été déterminées à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'acide ascorbique, (0,1 à 0,00625mg/ml), ont été utilisés comme témoins positifs, tandis que le méthanol a été utilisé comme témoin négatif. Les échantillons ont été testés en trois répétitions pour chaque concentration.

La valeur de la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) indique la quantité d'HE nécessaire pour réduire 50% des radicaux de DPPH. La CI_{50} est employée comme estimation de l'activité antioxydante par le test DPPH et a été évaluée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (PI%) en fonction des concentrations des HEs (Mssillou et al., 2020). Le pourcentage d'inhibition (PI%) du DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$\textbf{PI (\%)} = \frac{\textbf{Abs}_{\textbf{contrôle}} - \textbf{Abs}_{\textbf{échantillon}}}{\textbf{Abs}_{\textbf{contrôle}}} \times \textbf{100}$$

Avec :

PI (%) : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

$Abs_{contrôle}$: Absorbance du contrôle.

$Abs_{échantillon}$: Absorbance de l'échantillon.

2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des HEs a été évalué selon le protocole décrit par Benkhaira et al., (2022) avec de légères modifications. De manière concise, une quantité de 100 µl d'HE à différentes concentrations ont été mélangés avec 250 µl de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6) et 250 µl de ferricyanure de potassium [K_3 Fe $(CN)_6$] à 1 %. Après, le mélange a été incubé dans un bain-marie à 55 °C pendant 20 min. Ensuite, un volume de 250 µl d'acide trichloracétique à 10% a été additionné pour arrêter la réaction, puis la solution a été centrifugée à 2500 tr/min pendant 8 min. Ultérieurement, 250 µl du surnageant a été mélangé avec 250 µl d'eau distillée et 50 µl de $FeCl_3$ (0,1 %). L'absorbance a été mesurée à 700 nm par rapport à un blanc comprenant tous les réactifs, à l'exception de l'échantillon. Les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'acide ascorbique, ont été utilisés comme standards. La capacité réductrice a été exprimée en concentration efficace (CE_{50}) ± SD (mg/ml). La CE_{50} correspondante à une absorbance de 0,5 a été calculée en traçant la courbe d'absorbance en fonction de la concentration concordante.

3. Optimisation de l'activité antioxydante par application du plan de mélange

3.1 Matériel végétal

En se basant sur les résultats des activités antioxydantes des quatre plantes examinées, leur origine, leur famille, leurs rendements d'extraction, ainsi que leur disponibilité, et après une recherche bibliographique approfondie, trois plantes, à savoir *E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, ont été sélectionnées pour optimiser leurs effets antioxydants.

3.2 Réponses choisies

Afin de réaliser une évaluation complète de l'activité antioxydante des mélanges des HEs, deux méthodes analytiques complémentaires basées sur des mécanismes différents ont été choisies, à savoir le test de piégeage des radicaux DPPH et le test du pouvoir réducteur du fer.

3.3 Plan de mélange et analyse statistique

3.3.1 Plan de mélange utilisé et identification des facteurs et des réponses

Un plan de mélange centré augmenté (Augmented Simplex-centroid design) avec trois composants purs a été utilisé comme plan expérimental pour évaluer et optimiser les propriétés antioxydantes synergiques des HEs étudiées (Baj et al., 2018; Goupy and Creighton, 2007).

Les facteurs sont des grandeurs censées influencer les variations de réponse. Ils représentent la proportion de chaque HE dans le mélange et peuvent prendre n'importe quelle valeur comprise entre 0 et 1, de telle sorte que la somme des trois proportions est égale à 1 (tableau 11). Il s'agit donc d'un mélange sans contraintes (Chraibi et al., 2023; Kachkoul et al., 2021). En outre, les réponses $DPPH_{IC50}$ et pouvoir réducteur CE_{50} ont été utilisées pour évaluer la capacité antioxydante des HEs étudiées.

Tableau 11. Identification des variables indépendantes utilisées dans le mélange.

Constituant	Variables codées	Niveau Min	Niveau Max	Réponse étudiée	Unité
EPHE	E1	0	1	CI_{50}	
OMHE	E2	0	1	CE_{50}	mg/ml
LBHE	E3	0	1		
Somme des proportions		1			

Avec: EPHE: HE d'*E. polybractea*, OMHE: HE d'*O. Mixta*, LBHE: HE de *L. burnatii*

3.3.2 Matrice d'expériences et modèle mathématique

Dans la présente étude, douze expériences ont été réalisées et représentées sous la forme d'un triangle équilatéral, comprenant les trois huiles pures (100%) correspondant aux sommets du triangle (E_1, E_2, E_3), des mélanges binaires (50%/50%) conformes aux points médians des trois côtés du triangle (E_4, E_5, E_6), un mélange équi-proportionnel des trois HEs (33%/33%/33%) situé aux centroïdes du triangle (point central) (E_7), cet essai a été réalisé en trois répétitions distinctes, et trois points augmentés (E_{10}, E_{11}, E_{12}) attribués à des combinaisons ternaires (67%, 16%, 16%) (Ouedrhiri et al., 2016; Zeouk et al., 2020). Les facteurs représentent les proportions de chaque HE dans chaque combinaison, et leurs valeurs peuvent varier de 0 à 1 (Aouan et al., 2023a; Benkhaira et al., 2023). Le tableau 12 indique la proportion de chaque constituant dans chaque formulation.

Tableau 12. Matrice des expériences générées.

Nombre d'expérience	EPHE (E_1)	OMHE (E2)	LBHE (E3)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,333	0,333	0,333
8	0,333	0,333	0,333
9	0,333	0,333	0,333
10	0,667	0,167	0,167
11	0,167	0,667	0,167
12	0,167	0,167	0,667

EPHE: HE d'*E. polybractea,* OMHE: HE d'*O. mixta*, LBHE: HE de *L. burnatii.*

Les variables dépendantes (les réponses) sont la capacité antioxydante des HEs étudiées, évalués à travers deux méthodes analytiques complémentaires, à savoir le test du piégeage du radical libre ($DPPH^{\bullet}$), et le test du pouvoir réducteur du fer.

Ensuite, les données ont été ajustées à un modèle spécial cubique en appliquant la régression des moindres carrés afin d'estimer les coefficients inconnus dans l'équation (2).

$$Y = \sigma_1 E_1 + \sigma_2 E_2 + \sigma_3 E_3 + \sigma_{12} E_1 E_2 + \sigma_{13} E_1 E_3 + \sigma_{23} E_2 E_3 + \sigma_{123} E_1 E_2 E_3 + \varepsilon \quad (2)$$

Avec : Y est la réponse expérimentale exprimée en mg/ml pour CI_{50} et CE_{50}.
Ei : Proportions du constituant (i) dans le mélange.
σ_1, σ_2 et σ_3 sont les coefficients des termes linéaires.
σ_{12}, σ_{13} et σ_{23} sont les coefficients des termes binaires.
σ_{123} : Coefficient des termes ternaires.
ε : Le terme d'erreur.

3.4 Analyse statistique et optimisation

3.4.1 Analyse statistique

Les données ont été soumises à une analyse statistique à l'aide de deux logiciels, Design Expert version 12 et SAS JMP® version 14 (Aouan et al., 2023b; Chraibi et al., 2023). Le test ANOVA a été utilisé pour vérifier la signification des modèles ajustés. Ainsi, le $F_{ratio\ (R/r)}$ a été calculé, avec (CM_R) comme le carré moyen dû à la régression et (CM_r) comme le carré moyen résiduel.

En outre, la qualité des modèles mathématiques postulés a été confirmée par les coefficients de détermination R^2, $R^2_{\ ajusté}$, tandis que la signification statistique des coefficients estimés a été évaluée à l'aide du test *t*-student (Aouan et al., 2023a; Mahmud et al., 2023).

3.4.2 Outils de l'optimisation

Les outils d'optimisation ont été utilisés comme un excellent moyen de prédire la combinaison optimale des trois HEs étudiées. Dans ce contexte, des tracés d'optimisation 2D et 3D, basés sur des courbes d'iso-réponse, ont été utilisés pour identifier les zones de compromis optimales conduisant à la réponse souhaitée. Ces courbes permettent de rechercher avec précision les intervalles de réglages des facteurs afin d'obtenir la réponse désirée (Ez-zoubi et al., 2021; Perez-Cortes and Escalante-Garcia, 2020). Après la détermination du modèle et la vérification de sa validité, les courbes d'iso-réponses sont tracées dans le domaine expérimental. Ces courbes illustrent les plans des surfaces de réponse, c'est-à-dire la représentation graphique des modèles estimés afin d'identifier les optimums.

Ensuite, la fonction "Désirabilité" a été utilisée pour déterminer la combinaison optimale exacte avec un pourcentage de compromis. Cet outil permet de définir le réglage optimal précis avec un pourcentage compris entre 0 et 1. La valeur 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable, tandis qu'une valeur de 1 représente la réponse maximale souhaitée (Candioti et al., 2014; Izadiyan and Hemmateenejad, 2016). En fin, pour finaliser l'étude de l'optimisation, nous procédons à l'étude du point test sur le mélange optimal. Il s'agit d'une étude expérimentale réalisée pour confirmer la validité et la prédictibilité du modèle postulé.

Partie III : Résultats et Discussion

I. Description, rendement et compositions chimiques des huiles essentielles

1. Rendement et caractéristiques des huiles essentielles

Après l'extraction, les caractéristiques organoleptiques ainsi que le rendement des HEs obtenues à partir des parties aériennes d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia* ont été déterminés. Les résultats sont exposés dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.

Plantes	Rendements en HE (%)	Aspect	Couleur	Odeur
E. polybractea	2,13 ±0,35	Liquide	Jaune foncé à orangé	Aromatique et camphrée
O. mixta	0,76±0 ,008	Liquide	Jaune pâle	Agréable un peu camphrée
L. burnatii	1,48 ± 0,11	Liquide	Incolore à jaune pâle	Caractéristique, agreste, légèrement camphrée.
L. angustifolia	1,51 ± 0,17	Liquide	Jaune pâle	Suave et herbacée

* Moyenne ± erreur standard de la moyenne.

L'extraction de la partie aérienne d'*E. polybractea* par hydrodistillation a produit une HE ayant une odeur spécifique, une couleur jaunâtre à orangée, et un rendement de 2,13 ± 0,35 %. Plusieurs études ont été réalisées sur l'HE du genre Eucalyptus. Ainsi, Horváth and Ács (2015) ont montré que les HEs d'*E. polybractea*, *Eucalyptus smithii* R.T. Baker et *Eucalyptus globulus* Labill ont un rendement allant de 0,5 à 3,5 %. De même, des rendements variant de 1,2% à 3% ont été reportés pour sept espèces d'*Eucalyptus*, cultivées dans divers arboretums en Tunisie (Sebei et al., 2015). De plus, Sharma et ses collaborateurs (2022) ont montré que l'extraction par hydrodistillation à base de chaleur directe d'*E. polybractea* produisait un rendement de 0,81%, tandis que l'extraction par hydrodistillation à chaleur indirecte de la même espèce augmentait le rendement à 0,87 %.

L'hydrodistillation des parties aériennes d'*O. mixta* donne un rendement en HE de 0,76 ± 0,008 %. Ce qui est concordant avec les résultats d'autres études qui ont reportés des rendements, de l'HE d'*O. mixta,* entre 0,10 et 0,80% (Elouaddari et al., 2019a). En effet, Ouedrhiri et al. (2018) ont montré que *O. mixta*, collectée dans la région de Taounate, présente un rendement de 0,7 %. Une autre étude réalisée sur *O. mixta* de la région de Casablanca a révélé un rendement en HE de 0,8 % (Elouaddari et al., 2019b).

En outre, Anass et al. (2015) qui ont étudié le rendement de différentes parties de la plante (fleurs et feuilles) d'*O. mixta* provenant de cinq régions du Maroc (Sidi Allal Elbahraoui, Tamesna, Kenitra, Benguerir, et Settat) ont montré que le rendement en HE produite par les fleurs est considérable (entre 0,83 et 1,67 %) par rapport à celle des feuilles (entre 0,56 et 0,86 %). De plus, les HEs des fleurs et des feuilles de la région de Tamesna ont révélé le rendement le plus élevé (1,67 - 0,86 %).

Concernant l'hydrodistillation de la partie aérienne de *L. burnatii*, un rendement de 1,48 ± 0,11% a été obtenu. Ce rendement reste inférieur à celui rapporté pour *L. burnatii* cultivée en Roumanie (2,75%) (Jianu et al., 2013), et pour la même espèce de la région d'Isparta en Turkie (1,2 %) (Baydar et al., 2009). De plus, une autre étude réalisée sur 10 populations de lavandin d'origine Iranienne a révélé une variabilité remarquable en termes de rendement, allant de 0,52 à 1,51% (Bajalan et al., 2017). Le rendement obtenu en HE de *L. angustifolia* est de 1,51 ± 0,17%. Cette valeur reste inférieure à celle rapportée par d'autres études réalisées dans différentes régions du Maroc. En effet, Slimani et al (2022) ont démontré que *L. angustifolia*, collectée dans la région de Meknès, a un rendement de 2,13 %. Une autre étude réalisée sur *L. angustifolia* de la région d'Essaouira a révélé un rendement en HE de 2,32 ± 0,06 (Moussii et al., 2020). En revanche, Djenane et al. (2012) ont rapporté un rendement en HE de 0,21% des échantillons d'Algérie.

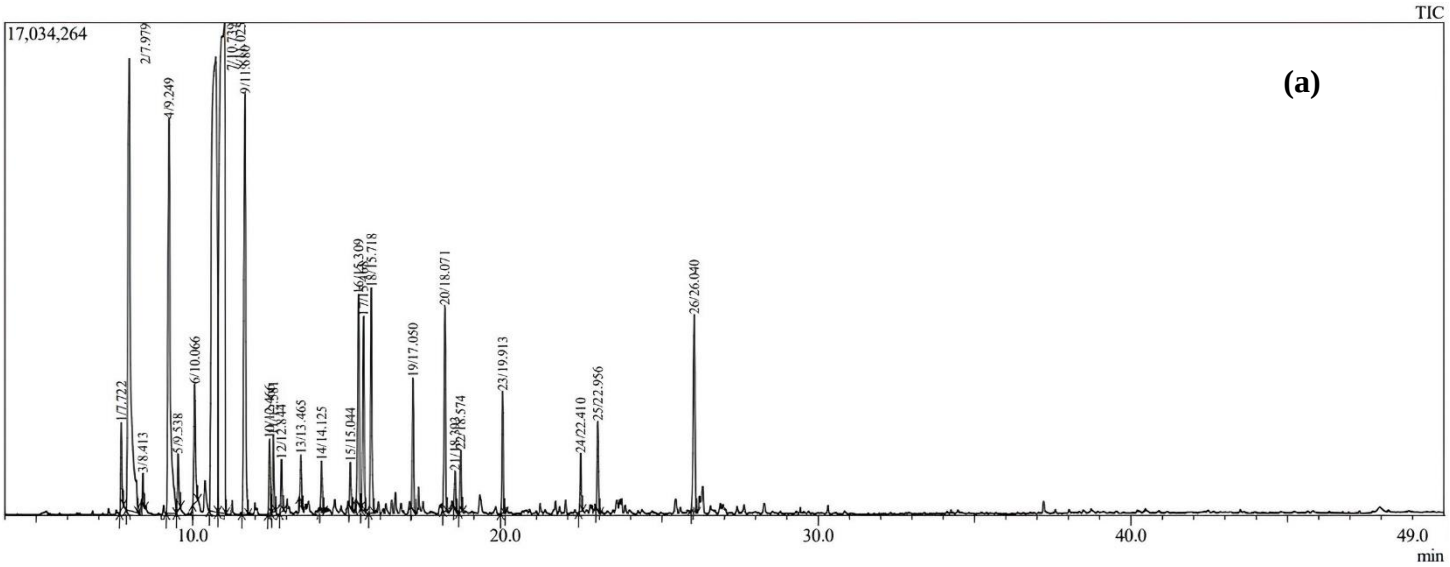
La variation des rendements en HEs peut être due à plusieurs facteurs, notamment l'environnement, le génotype, l'âge, le climat, et l'origine géographique de la plante (Bouyahya et al., 2017c; El Hachlafi et al., 2023b), ainsi que la période de récolte, la méthode et les conditions d'extraction, et la partie de la plante utilisée (Jeddi et al., 2023b; Mrabti et al., 2023), la maturité de la plante et l'interaction avec l'environnement.

2. Analyse de la composition chimique des HEs par CPG/MS

La composition chimique des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia* a été déterminée par analyse CPG/SM. Le tableau 14 résume le pourcentage de chaque constituant, l'ordre d'élution, la formule moléculaire, l'indice de kovats (IK) et le groupe chimique. Au total, 72 composants volatils (figure 14) ont été détectés dans les quatre HEs examinées. En effet, vingt-cinq, vingt-huit, trente-trois et trente composants bioactifs ont été identifiés dans les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia*, respectivement, représentant environ 99,98 % ; 95,82% ; 99,48% et 98,39% de la composition de ces huiles.

L'HE extraite d'*E. polybractea* se distingue par la dominance des monoterpènes hydrocarbonés (57,18%), et des monoterpènes oxygénés (38,73 %), suivis des sesquiterpènes oxygénés (3,14%) et des sesquiterpènes hydrocarbonés (0,97 %). Les principaux constituants bioactifs détectés dans cette HE sont le 1,8-cinéole (23,75%), le *p*-cymène (22,74%) et l'*α*-pinène (11,20%). En outre, des composés tels que le *β*-pinène (8,08%), le *γ*-terpinène (7,29%) et le *α*- terpinéol (3,11%) ont également été identifiées. Par ailleurs, l'HE d'*O. mixta* a révélé des pourcentages élevés de sesquiterpènes hydrocarbonés (36,27%) et de monoterpènes oxygénés (27,67%), ainsi qu'une proportion modérée de monoterpènes hydrocarbonés et de sesquiterpènes oxygénés, avec 17,24% et 11,13%, respectivement. Ainsi, le *p*-menthane-1,8-diol (18,19%), l'*α*-pinène (10,81%) et le germacrène D (9,17%) sont les principaux constituants de cette HE. D'autres composants ont également été identifiés en faibles proportions, notamment le *β*- farnésène (7,58%), le *δ* - Elemène (7,18%), le Caryophyllène (3,59 %) et le *β*-Pinène (3,17%).

Concernant les HEs de *L. burnatii* et *L. angustifolia*, les monoterpènes oxygénés étaient les constituants les plus dominants, avec des pourcentages de 62,49 % et 68,31 %, respectivement. Les monoterpènes hydrocarbonés sont également présents à une proportion de 8,61 % et 13,69 % pour les HEs de *L. burnatii* et *L. angustifolia*, respectivement.



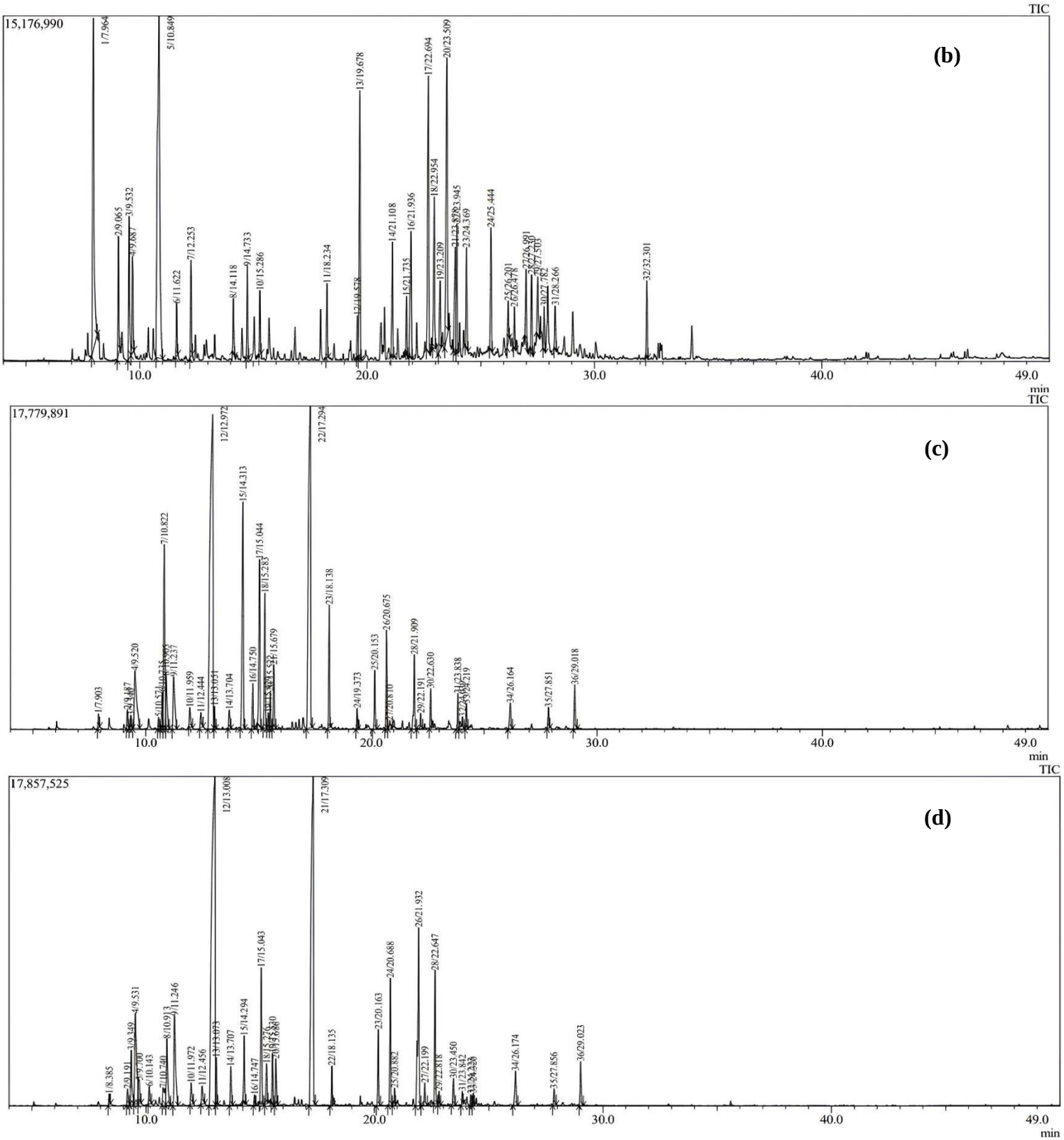


Figure 14. Chromatogramme d'analyse par GC-MS des HEs de (a) *E. polybractea,* (b) *O. mixta,* (c) *L. burnatii* et (d) *L. angustifolia.*

Tableau 14. Composition chimique de l'huile essentielle des quatre plantes étudiées**.**

N°	Composés	Formule chimique	IK*	% Aire du pic relative			
				E. polybractea HE	*O. mixta* HE	*L. burnatii* HE	*L. angustifolia* HE
1	α- Thujène	$C_{10}H_{16}$	902	0,94	-	-	-
2	Camphène	$C_{10}H_{16}$	943	0,26	-	-	0,25
3	α-Pinène	$C10H_{16}$	948	**11,20**	**10,81**	0,33	-
4	3-Octanone	$C_8H_{16}O$	952	-	-	0,40	1,76
5	β-Myrcène	$C_{10}H_{16}$	958	0,72	-	-	-
6	*p*-Menthane-1,8-diol	$C_{10}H_{20}O_2$	970	-	**18,19**	-	-
7	Sabinène	$C_{10}H_{16}$	975	-	2,29	-	-
8	β-Pinène	$C_{10}H_{16}$	980	8,08	3,17	3,73	4,67
9	Yomogi alcool	$C_{10}H_{18}O$	998	-	1,96	-	-
10	α- Phellandrène	$C_{10}H_{16}$	1005	1,76	-	-	-
11	D-Limonène	$C_{10}H_{16}$	1031	-	-	1,10	1,14
12	Sabinène hydrate	$C_{10}H_{18}O$	1041	-	-	1,92	-
13	*p*-Cymène	$C_{10}H_{14}$	1042	**22,74**	-	0,33	-
14	α-Ocimène	$C_{10}H_{16}$	1050	**-**	-	-	2.55
15	β-Ocimène	$C_{10}H_{16}$	1051	-	-	2,51	3,94
16	Terpinolène	$C_{10}H_{16}$	1052	0,87	-	-	-
17	1,8-Cinéole	$C_{10}H_{18}O$	1059	**23,75**	-	6,57	-
18	γ-Terpinène	$C_{10}H_{16}$	1062	7,29	0,97	-	0,97
19	Oxyde de linalol	$C_{10}H_{18}O_2$	1080	-	-	1,21	1,4
20	Alcool d'artemisia	$C_{10}H_{18}O$	1084	-	1,95	-	-
21	Linalol	$C_{10}H_{18}O$	1097	0,62	-	**24,40**	**28,94**
22	1-Octène-3-yl-acétate	$C_{10}H_{18}O_2$	1109	-	-	0,49	1,04
23	(E)- Pinocarvéol	$C_{10}H_{16}O$	1131	0,59	1,17	-	-
24	Fenchyl alcohol	$C_{10}H_{18}O$	1138	0,48	-	-	-
25	Camphre	$C_{10}H_{16}O$	1143	-	-	**8,01**	1,71
26	Allo-Ocimène	$C_{10}H_{16}$	1147	0,66	-	0,61	1,14
27	Acétate d'artémisyle	$C1_2H_{20}O_2$	1153	-	1,75	-	-
28	Lavandulol	$C_{10}H_{18}O$	1162	-	-	1,16	0,27
29	Bornéol	$C_{10}H_{18}O$	1165	0,56	-	5,26	4,05

30	Terpinène-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	1177	2,85	1,26	3,79	1,15
31	Butanoate d'hexyle	$C_{10}H_{20}O_2$	1183	-	-	0,84	1.19
32	Cryptone	$C_9H_{14}O$	1188	2,69	-	-	-
33	[E]-3-Carène -2-ol	$C_{10}H_{16}O$	1188	2,66	-	-	-
34	*α*- Terpinéol	$C_{10}H_{18}O$	1189	3,11	-	1,71	1,27
35	Cuminaldéhyde	$C_{10}H_{12}O$	1230	1,57	-	-	-
36	Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	1262	0,70	-	-	-
37	Acétate de linalyle	$C_{12}H_{20}O_2$	1272	-	-	**18,68**	**19,95**
38	Acétate de bornyle	$C_{12}H_{20}O_2$	1277	-	1,39	-	-
39	Cuminol	$C_{10}H_{14}O$	1284	0,42	-	-	-
40	Acétate de lavandulyle	$C_{12}H_{20}O_2$	1291	-	-	2,98	0,87
41	Propionate de linalyle	$C_{13}H_{22}O_2$	1319	-	-	0,55	-
42	Tiglate d'hexyle	$C_{11}H_{20}O_2$	1331	-	-	0,48	-
43	Acétate d'α-terpinyle	$C_{12}H_{20}O_2$	1333	1,35	-	-	-
44	Hexanoate d'hexyle	$C_{12}H_{24}O_2$	1352	-	-	-	0.42
45	*δ* - Elemène	$C_{15}H_{24}$	1365	-	7,18	-	-
46	Acétate de géranyle	$C_{12}H_{20}O_2$	1379	-	-	3,75	4,93
47	β- Elemène	$C_{15}H_{24}$	1398	-	2,33	-	-
48	Bornyl isobutyrate	$C_{14}H_{24}O_2$	1412	-	1,03	-	-
49	α-Bergamotène	$C_{15}H_{24}$	1433	-	-	0,43	0,61
50	α-Muurolène	$C_{15}H_{24}$	1435	-	-	0,63	-
51	*β- cis* - Farnésène	$C_{15}H_{24}$	1440	-	-	0,92	3,46
52	Caryophyllène	$C_{15}H_{24}$	1440	-	3,59	2,21	**6,46**
53	(Z)-*β*- Farnésène	$C_{15}H_{24}$	1440	-	7,58	-	-
54	α-Humulène	$C_{15}H_{24}$	1454	-	-	-	0.34
55	*α*- Farnésène	$C_{15}H_{24}$	1458	-	2,46	-	-
56	Allo-aromadendrène	$C_{15}H_{24}$	1461	0,97	-	-	-
57	α- Muurolène	$C_{15}H_{24}$	1499	-	2,97	-	-
58	*β*- Bisabolène	$C_{15}H_{24}$	1500	-	-	0,59	-
59	Lavandulyl	$C_{15}H_{26}O_2$	1504	-	-	0,84	-
60	*γ*- Cadinène	$C_{15}H_{24}$	1513	-	-	0,28	0,27
61	*δ*- Cadinène	$C_{15}H_{24}$	1524	-	1,99	-	-
62	Trans- Nérolidol	$C_{15}H_{26}O$	1564	-	2,81	-	-

63	Spathulénol	$C_{15}H_{24}O$	1575	3,14	1,40	-	-
64	Germacrène D	$C_{15}H_{24}$	1480	-	**9,17**	-	0,76
65	Oxyde de caryophyllène	$C_{15}H_{24}O$	1581	-	2,53	0,90	1,21
66	Carotol	$C_{15}H_{26}O$	1593	-	1,60	-	-
67	Cédrénol	$C_{15}H_{24}O$	1604	-	0,91	-	-
68	*τ*- Muurolol	$C_{15}H_{26}O$	1641	-	1,04	-	-
69	*τ*- Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	1644	-	-	0,59	0,44
70	*α*-Bisabolol	$C_{15}H_{26}O$	1682	-	-	1,28	1,23
71	cis-Lancéol	$C_{15}H_{24}O$	1743	-	0,84	-	-
72	Acide butanoïque	$C_{15}H_{22}O_2$	1773	-	1,48	-	-
Total				**99,98**	**95,82**	**99,48**	**98,39**
Monoterpènes hydrocarbonés				57,18	17,24	8,61	13,69
Monoterpènes oxygénés				38,73	27,67	62,49	68,31
Sesquiterpènes hydrocarbonés				0,97	36,27	5,65	11,9
Sesquiterpènes oxygénés				3,14	11,13	0,9	2,88
Autres				-	1,03	22,28	1,61

*KI: Indice de Kovats.

Cependant, les sesquiterpènes étaient présents sous forme de traces. En outre, le linalol et l'acétate de linalyle sont les composés majeurs des HEs du genre de *Lavandula*, avec des pourcentages respectifs de 24,40% et 18,68 % pour l'HE de *L. burnatii*, et de 28,94% et 19,95 % pour l'HE de *L. angustifolia.*

Des études antérieures sur l'HE d'*E. polybractea* ont montré la prédominance du 1,8-cinéole et/ou *p*-Cymène (Akhtar et al., 2011; Aldoghaim et al., 2018; Horváth and Ács, 2015; Poli et al., 2018). De plus, Chibi et ses collaborateurs (2023) ont examiné le profil phytochimique des HEs d'*E. polybractea* collectée en Algérie, et ont montré que le 1,8-cinéole, et l'α-phellandrène sont les principaux composants identifiés avec des proportions de 34,87 % et 13,10 % respectivement. Une autre étude a montré que l'HE extraite par hydrodistillation des feuilles d'*E. polybractea*, originaire d'Australie, se caractérise par sa richesse en 1,8-cineole (82,95 %), suivi du limonène (3,67 %) et de l'α-Terpineol (3,55%) (Aldoghaim et al., 2018). De même, au Nord-Est de l'Argentine, une étude a révélé que le 1,8-Cineole (85,01 %) présente le pourcentage le plus élevé par rapport aux autres composants tels que la p-cymene (4,12 %), le 4-terpineol (1,48 %), et le limonène (1,00 %) (Juan et al., 2011).

En outre, le 1,8-cinéole (91,7–94.2 %), β-pinene (0,41–2,30 %), limonène (0,20–1.30 %), p-cymène (1,24–2,76 %), α- pinène (0–1,20 %) et terpinène-4-ol (0,60–0,93 %) constituaient les composants majoritaires de l'HE d'*E. polybractea* originaire du Pakistan (Akhtar et al., 2011).

Par ailleurs, Poli et ses collègues (2018) ont trouvé que l'HE de *E. polybractea* cultivée en France est riche en p-cymène (25,5%) et la cryptone (11,42%). Cependant, des études antérieures portant sur la composition chimique des HEs du genre *Eucalyptus* ont révélé d'autres chémotypes tels que pipéritone (40,50 %), et spathulenol (41.46%), citronellal (68.9%) avec un faible teneur de 1,8-cinéole et de *p*-Cymène (Gilles et al., 2010; Lee et al., 2008; Verdeguer et al., 2009).

En outre, il est intéressant de souligner que Sharma et ses collègues (2022) ont mis en évidence des fluctuations quantitatives et/ou qualitatives importantes dans le profil chimique des HEs d'*E. polybractea*, en fonction des procédures et des méthodes d'extraction. En effet, les principaux constituants identifiés dans l'HE d'*E. polybractea* extraite par la méthode d'hydrodistillation à base de chaleur directe sont l'eugénol (22,7%), β- pinène (10%), l'acide pentadécanoïque (10%), le carvacrol (2,3%), le 1,8 cinéole (2%), le camphor (1,3%), le β-cymène (0,9%) et le β-myrcène (0.5 %), tandis que les HEs d'*E. polybractea* extraites par d'hydrodistillation à base de chaleur indirecte sont principalement dominées par l'acide pentadécanoïque (11%), le β- pinène (10%), le 1,8 cinéole (10%), l'eugénol (7%), le limonène (3%), le β-cymène (3%) et le carvacrol (3%). Cela confirme l'affirmation selon laquelle les techniques d'extraction et les parties de la plante utilisées affectent la production de constituants bioactifs.

Concernant l'HE d'*O. mixta,* des études antérieures menées au Maroc ont révélé divers constituants volatils, dépendant de la localisation géographique et l'origine des plantes. En effet, Chraibi et ses collaborateurs (2021) ont analysé le profil phytochimique des HEs d'O. *mixta* récoltée dans la région de Taounate, où les composées majoritaires identifiés étaient l'alcool de santoline, et le farnésène, avec des proportions respectives de 37,51% et 6,24 %. En outre, Ouedrhiri et al. (2018) a montré que cette huile est riche en D-germacrène (11,46 %), le 1,8-cinéole (10,28 %) et le cis-méthylisoeugénol (9,04 %). Par ailleurs, une autre étude réalisée dans la région de Rabat a révélé que l'HE d'*O. mixta* est principalement constituée d'alcool de santoline, avec une teneur d'environ 38,1 %, suivie par l'a-pinene (5,10%), la camphenilone (4,90%), l'alcool de yomogi (4,60 %), le germacrene (3,40 %) et le 1,8-cineole (3,20 %) (Satrani et al., 2007).

En outre, des résultats comparables ont été rapportés par Zrira et al. (2007) montrant que les HEs d'*O. mixta*, collectées dans deux régions différentes du Maroc (Kénitra et Salé) étaient caractérisées par une teneur élevée en alcool de santoline (47,6 – 55,1٪).

Une étude antérieure a également montré un polymorphisme phytochimique significatif dans les HEs d*'O. mixta*, et a révélé que la composition chimique de neuf échantillons provenant de différentes régions du Maroc (Meknès, Benguerir, Settat, Kenitra, Tamesna, Oujda, Chefchaouane, Bouznika et Sidi Alal Ibahraoui) est fortement variable (Elouaddari et al., 2013). La nature et la teneur des constituants majoritaires variant considérablement d'une espèce à l'autre, dépendant de la localisation géographique et de l'origine des plantes. En effet, les HEs d'*O. mixta* collectées dans les régions de Kenitra, Meknès, Benguerir, Tamesna et Settat contenaient du camphre (14,1-28%), du β-myrcène (4-18%), et du santolina triène (4-16%), tandis que le β-myrcène (3,1-18%), le trans-β-farnésène (19%), et la tridécanone (17%) ont été identifiés dans l'échantillon de Chefchaouane. Cependant, les HEs d'*O. mixta* collectées à Oujda, Bouznika et Sidi Alal Ibahraoui sont principalement dominées par le β-farnésène (43%), le Méthacrylate de 2-méthyl-2-trans-butényle (34,1%) et la santoline (17%), respectivement. En outre, des recherches effectuées dans différentes régions du monde ont révélé la présence d'autre chémotypes dans les HEs d'*O. mixta* telle que t-cadinol, acide hexadécanoïque, alcool de yomogi et α-thujone (Darriet et al., 2012; Formisano et al., 2012; Samadi et al., 2012; Tadrent et al., 2016).

L'analyse phytochimique de l'HE de *L. burnati* cultivée au Maroc, n'a pas encore été entièrement dévoilée à l'aide d'une analyse CPG/SM. Cependant, des recherches réalisées dans différentes régions du monde ont révélé une large gamme de molécules bioactives. En effet, Bajalan et al. (2017) ont examiné les constituants volatils des parties aériennes de *L. burnati* collectées dans les monts Zagros, en Iran, et ont montré une variation significative dans leur composition chimique, avec la dominance du 1,8-cinéole (31,64 à 47,94 %), bornéol (17,11 à 26,14 %) et du camphre (8,41 à 12,68 %). De plus, l'acétate de linalyle (47,7 %), le linalol (34,0 %), le camphre (4,8 %), et le bornéol (4,2 %) représentaient les principaux composants de l'HE de *L. burnati* d'origine turque (Baydar and Kineci, 2009). Par ailleurs, dans une autre étude réalisée par Garzoli et al. (2019) sur *L. burnatii* cultivée dans la région du Latium, en Italie ; le linalol (41,60 %), l'acétate de linalyle (23,0 %), le 1,8-cinéole (5,20 %) et le terpinen-4-ol (4,8 %) étaient les constituants les plus abondants.

Des résultats similaires ont été rapportés par Blažeković et al. (2018), montrant que l'HE de *L. burnatii* d'origine Croate, se caractérise par sa richesse en linalol (57,1 %), suivi de l'acétate de linalyle (9,8 %) et du 1,8-cinéole (8,4 %). Cependant, l'analyse de l'HE de lavandin, obtenue par hydrodistillation de la plante cultivée à Lublin (Pologne), a révélé une composition riche en linalol (29,56 %), en acétate de linalyle (18,56 %), ainsi qu'en acétate de lavandulyle (5,90%) (Walasek-Janusz et al., 2022). En revanche, le linalol (32,2%), l'acétate de linalyle (29,7%), 1,8-Cineole (7,6%) et le camphre (7,1%) ont été identifiés comme des constituants majeurs dans les échantillons de lavandin originaires d'Espagne (Carrasco et al., 2016; Pokajewicz et al., 2023a), tandis que les HEs de lavandin d'origine Roumaine étaient plus riches en camphre (32,7%) et en 1,8-cinéole (26,9%) (Jianu et al., 2013).

L'analyse chimique de l'HE de *L. angustifolia* a révélé la présence de divers composés bioactifs, appartenant principalement à la classe des monoterpènes oxygénés, tels que le linalol (28,94 %), et l'acétate de linalyle (19,95 %). De nombreuses études ont élucidé les constituants volatils de *L. angustifolia* collectés dans différentes régions (Caprari et al., 2023; Jianu et al., 2013; Lahkimi et al., 2020; Moussi Imane et al., 2017; Pokajewicz et al., 2021; Slimani et al., 2022; Smigielski et al., 2009; Todorova et al., 2023; Walasek-Janusz et al., 2022). Une grande similitude, avec de légères fluctuations, a été constaté entre nos résultats et ceux des recherches nationales et internationales sur la composition chimique de l'HE de *L. angustifolia*. Une étude a montré que les HEs de *L. angustifolia* de la région de Taounate (nord-est du Maroc) étaient dominées par le linalol (32,23 %), l'acétate de linalyle (14,23 %) et le géraniol (5,90 %) (El-Akhal et al., 2021). Par ailleurs, Moussi Imane et al. (2017) ont constaté que l'HE de *L. angustifolia* de la région d'Essaouira est riche en linalol (21,81%), en eucalyptol (18,07%), et en camphre (11,89%). Cependant, une autre étude menée dans la région de Meknès a révélé que l'HE de *L. angustifolia* se compose principalement de linalol, d'acétate de linalyle et de ρ-cymène, avec des pourcentages respectifs de 29,95 %, 18,86 % et 14,68 % (Slimani et al., 2022). En revanche, Radi et ses collaborateurs (2022) ont signalé que les principaux constituants de l'HE de *L. angustifolia* collectés dans la région d'Ifrane sont le camphre (20,0 %), le 1,8-cinéole (16,68 %) et l'acétate de linalol (13,66 %). Récemment, l'analyse de la composition chimique des HEs de *L. angustifolia* cultivée en Bulgarie a révélé que le linalol (20,2-45,0%) et l'acétate de linalyle (21,0-40,0%) étaient les composés dominants dans tous les échantillons testés (Todorova et al., 2023).

En outre, le linalol (33,1 %), l'acétate de linalyle (10,4 %) et l'eucalyptol (8,0 %) représentaient les principaux composants de l'HE de *L. angustifolia* d'origine italienne (Caputo et al., 2016). De même, Pokajewicz et al. (2021) ont révélé que les HEs des cultivars ukrainiens de *L. angustifolia* se caractérisent principalement par le linalol (11,42-44,05 %), le 4-terpinéol (1,1-11,25 %) et l'acétate de linalyle (15,79-35,27 %).

Cependant, le linalol (22,35%), l'acétate de linalyle (21,80%), le 4-terpinéol (5,19%) constituaient les composants majoritaires de l'HE d'*E. polybractea* originaire d'Algérie (Djenane et al., 2012). Cette divergence entre les profils chimiques étudiées peut s'expliquer par la variabilité des conditions écologiques entre les origines géographiques des plantes.

Prises ensemble, le polymorphisme chimique de ces espèces peut s'expliquer par plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques, notamment les conditions environnementales (climat, composition du sol (Zn, Fe, Cu)), les variations saisonnières, les stades phénologiques, l'origine géographique, ainsi que la période de récolte, la méthode et les conditions d'extraction, et la partie de la plante utilisée (Bouyahya et al., 2017; El Hachlafi et al., 2023c; Mrabti et al., 2023; Ouedrhiri et al., 2022). En outre, le bagage génétique des variétés de ces plantes pourrait également influencer les constituants des huiles volatiles (Mohammedi et al., 2020). Ces facteurs peuvent moduler les niveaux d'expression de certaines enzymes clés, conduisant à la régulation de la biosynthèse, du métabolisme et de la sécrétion des métabolites secondaires (Al-Mijalli et al., 2023b; Benkhaira et al., 2023; Zengin et al., 2016; Zhang et al., 2023).

II. Activité antimicrobienne

1. Diffusion sur disque d'agar - Criblage antimicrobien

Le pouvoir antimicrobien des quatre HEs examinées a été évalué à l'aide de la méthode de diffusion sur disque. D'une manière générale, cette méthode présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques : est simple, sensible, facile de mettre en œuvre et nécessite un faible volume d'échantillons (huile). Toutefois, cette méthode ne permet pas de distinguer entre les actions bactériostatiques et bactéricides, fournissant uniquement des données qualitatives en catégorisant la sensibilité des souches microbiennes (résistantes, intermédiaires ou sensibles) (Bouyahya et al., 2017b; Moreira et al., 2005). Les zones d'inhibition obtenues pour les différentes souches étudiées sont indiquées dans le tableau 15 .

Les résultats obtenus révèlent que les quatre HEs examinées manifestent une activité inhibitrice contre les cinq souches microbiennes testées, à savoir *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *C. albicans*. En fait, l'HE d*'E. polybractea* s'est avérée la plus efficace contre toutes les souches microbiennes, avec des zones d'inhibition comprises entre 13,91 ± 2,43 mm et 21,53 ± 1,04 mm. En outre, l'HE de *L. burnatii* a également un effet antimicrobien relativement important, avec des zones d'inhibition allant de 11,17 ± 0,81 mm à 27,15 ± 2,13 mm.

Toutefois, l'HE de *L. angustifolia* a montré une activité modérée contre les souches testées, avec des zones d'inhibition variant entre 9,61 ± 0,48 mm et 20,1 ± 2,08 mm. En revanche, l'HE d'*O. mixta* a manifesté le plus faible pouvoir inhibiteur contre toutes les souches microbiennes testées, avec des diamètres d'inhibition compris entre 7,93 ± 0,28 mm et 14,91 ± 0,76 mm. Cependant, les agents antimicrobiens de référence contre les bactéries et les levures restent les plus efficaces. En général, les bactéries à $Gram^+$ telles que *S. aureus* et *B. cereus* ont démontré une grande sensibilité aux HEs testées par rapport aux bactéries à $Gram^-$. Toutefois, certaines bactéries à $Gram^-$, telles que *E. coli* et *P. aeruginosa*, ont manifesté une sensibilité à l'HE d'*E. polybractea*.

Tableau 15. Diamètres d'inhibition des HEs et des antibiotiques par rapport aux souches testées.

	Zones d'inhibition (mm)						
	HEs				**Antibiotiques**		
Souches	***E. polybractea***	***O. mixta***	***L. burnatii***	***L. angustifolia***	**Gentamicin**	***Kanamycin***	**Fluconazole**
E. coli	17,1±0,51^{c}	9,5±0,57 ^{a}	11,3±0,19 ^{b}	10,01±1,18 ^{a}	20,8±0,10 ^{d}	25,93±1,21^{e}	NA
P. aeruginosa	13,9±2,43 ^{c}	7,9±0,28 ^{a}	13,1±0,67 ^{c}	9,6±0,48 ^{b}	16,3±0,24 ^{d}	21,13±0,73^{e}	NA
S. aureus	21,5±1,04 ^{c}	14,9±0,76 ^{a}	27,1±2.13 ^{d}	20,1±2.08 ^{b}	31,3±1,21 ^{f}	29,67±1,03^{e}	NA
B. cereus	18,8±2,31^{d}	12,1±1,59 ^{a}	16,3±1,11^{c}	14,2±1,12 ^{b}	19,2±0,82 ^{d}	23,13±0,41^{e}	NA
C. albicans	16,1±0,58 ^{c}	13,4±0,76 ^{b}	11,1±0,81 ^{a}	10,9±0,5 ^{a}	NA	NA	23,61 ± 1.41^{d}

*NA : non appliqué. *Les résultats sont exprimés par moyenne de trois répétitions (n=3) avec ± l'écar-type. *Les données avec la même lettre montrent une différence non significative par le test de Tukey (ANOVA, $p < 0,05$).

De nombreuses études sur le mode d'action antimicrobien des constituants des HEs ont été menées sur les bactéries, tandis que l'on en sait moins sur leur action sur les levures et les moisissures. Les bactéries à $Gram^-$ sont généralement moins sensibles que les $Gram^+$, en raison de leur membrane externe contenant des LPS hydrophiles, qui créent une barrière contre les macromolécules et les

composés hydrophobes (Hancock, 1997; Helander et al., 1998; Hyldgaard et al., 2012; Nikaido, 2003, 1994; Trombetta et al., 2005). Cet effet semble dépendre de la composition lipidique et de la charge nette de la surface des membranes microbiennes (Trombetta et al., 2005).

Généralement, l'activité antimicrobienne des quatre HEs examinées a déjà été rapportée par de nombreuses études. L'HE d'*E. polybractea* a montré une activité antibactérienne importante contre diverses souches à $Gram^-$ et à $Gram^+$ telles que *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Acinetobacter baumannii* NCTC 7844 ; ainsi qu'un effet antifongique remarquable contre *C. albicans* ATCC 90028 (Aldoghaim et al., 2018). De même, l'HE d'*E. polybractea* cultivée en Inde a montré une activité antibactérienne satisfaisante contre *P. aeruginosa* MTCC-424, *S. aureus* MTCC-3160 et *E. coli* MTCC-40, avec des zones d'inhibition comprises entre 22 ± 0.2 et 31 ± 0.1 mm (Sharma et al., 2022). De plus, des études antérieures à propos de l'activité antifongique de l'HE d'*E. polybractea*, de diverses origines, ont été effectuées.

Chibi and Hassaine (2023) ont évalué l'activité antifongique de l'HE d'*E. polybractea* sur dix espèces de champignons. En effet, *Trichoderma viride*, *Penicillium sp*2, *Fusarium graminearum* et *Aspergillus flavus* étaient les souches les plus sensibles à cette huile. De même, les HEs d'*Eucalyptus*, testées sur les moisissures et les champignons filamenteux ont montré une activité antifongique sur diverses souches d'origine clinique (*Candida saké, C. albicans* et *Candida parapsilosis*) (9.00 mm< Ø.I. < 19.66 mm) (Ghazghazi et al., 2019) et sur des dermatophytes (*Microsporum gypseum, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis*) (12 mm< Ø.I. < 90 mm) (Tolba et al., 2015). L'activité antimicrobienne de cette huile peut être attribuée à ses principaux constituants, tels que le 1,8 cinéol, le *p*-cymène, et l'*α*-pinène et leurs groupes fonctionnels, ainsi qu'aux effets synergiques entre les différents composants (majeurs et mineurs) de cette HE (Burt, 2004; da Silva et al., 2021; Jeddi et al., 2023b).

De nombreuses investigations ont porté sur les activités antimicrobiennes des HEs de *L. burnatii*, démontrant leur efficience contre différents micro-organismes. En effet, Pljevljakusic et al. (2023) ont évalué l'activité antimicrobienne de trois HEs de *Lavandula*, cultivée en Macédoine, et ont confirmé la présence d'une activité antibactérienne contre *S. aureus* ATCC 25923 (84±4 < Ø.I. < 97±2 mm) et *E. coli* ATCC 25922 (51±3 < Ø.I. < 77 mm), ainsi qu'une activité antifongique contre

C. albicans ATCC 1023 (49±5 < ⊖.I. < 57±4 mm). De plus, l'extrait d'hydrolat et l'HE de *L. burnatii* provenant de Latium (Italie) ont montré une activité antibactérienne satisfaisante contre *E. coli*, *Acinetobacter bohemicus*, *Pseudomonas fluorescens, Kocuria marina* et *Bacillus cereus* (Garzoli et al., 2019). De même, Jianu et al. (2013) ont montré que l'HE de *L. burnatii* cultivée en Roumanie, utilisée à différentes concentrations (5, 10, 15 et 20 µL), possède une activité anti-bactérienne prometteuse contre diverses souches ; et que parmi les différentes espèces de lavande testées, cette HE était relativement plus efficace contre *Shigella flexneri, Salmonella typhimurium, S. aureus* et *E. coli*, avec des zones d'inhibition entre 8,28 ± 0,14 et 26,09 ± 0,19 mm.

En outre, des études antérieures sur l'efficacité antifongique de l'HE de *Lavandula*, de diverses origines, ont été effectuées. Al-Ansari et al. (2021) ont évalué l'activité antifongique de l'HE de *Lavandula latifolia* contre cinq espèces de champignons. En effet, *Trichophyton mentagrophytes* (31 ± 1mm), *Aspergillus flavus* (24 ± 2 mm) et *Aspergillus nidulans* (19 ± 1 mm) étaient les souches les plus sensibles à cette huile. De même, les HEs de *L. burnatii*, testées sur les moisissures et les champignons filamenteux, ont montré une action antifongique sur différentes souches d'origine clinique telles que *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* et *C. albicans*, ainsi que sur des dermatophytes tels que *Microsporum gypseum, Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis,* et *Trichophyton mentagrophytes*, avec des zones d'inhibition importantes (Blažeković et al., 2018).

L'HE de *L. angustifolia* a également démontré un pouvoir antimicrobien significatif contre de nombreuses bactéries, moisissures et levures. En effet, Lahkimi et al. (2020) ont montré que l'HE de *L. angustifolia*, cultivée dans le Moyen Atlas Central (Maroc), possède une activité antibactérienne prometteuse contre *Bacillus subtilis* (25 mm), *Salmonella enterica* (21 mm), *S. aureus* (17 mm), *E. coli* (19 mm), et *P. aeruginosa* (14 mm). De même, l'HE de *L. angustifolia* provenant de Victoria, Australie, a montré une activité antimicrobienne importante contre *S. aureus* (28.1±2.3mm), *E. coli* (16.3±1.3), *E. faecalis* (11.4±0.6) et *C. albicans* (28.2±3.0) (Danh et al., 2013). En outre, Radi et al. (2022) ont montré que l'HE de *L. angustifolia*, cultivée dans le Moyen-Atlas (Maroc), utilisée à différentes concentrations (2, 4, 6, 8, 10 et 12 µl), possède une activité antifongique prometteuse contre diverses souches.

Les résultats ont indiqué que parmi les deux espèces testées (*L. angustifolia* et *Lavandula pedunculata*), l'HE de *L. angustifolia* était relativement plus active contre *C. albicans*, *Aspergillus fisheri*, *Candida ssp*, avec des diamètres d'inhibition de 52 ± 0,1, 40 ± 2,1 et 33 ± 1,2 mm, respectivement.

Les propriétés inhibitrices des HEs de *L. burnatii* et de *L. angustifolia* peuvent être attribuées à la présence de substances antimicrobiennes telles que le linalol, l'acétate de linalyle et le camphre (De Martino et al., 2009; Magiatis et al., 2002; Sokovic et al., 2008; Soković et al., 2010), ainsi qu'aux interactions entre les différents composants (majeurs et mineurs) de ces huiles.

Plusieurs investigations ont porté sur les propriétés antimicrobiennes de l'HE d'*O. mixta,* révélant leur efficacité contre un large éventail de microorganismes. En effet, Elouaddari et al. (2019) ont évalué l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'extrait méthanolique d'*O. mixta,* confirmant la présence d'une activité antibactérienne importante contre *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *B. cereus,* avec des diamètres d'inhibition allant de 11 à 27 mm, ainsi qu'une activité antifongique contre *C. albicans* ATCC 10231, avec des zones d'inhibition compris entre 13 et 29 mm. De même, l'HE d'*O. mixta* a également montré une activité intéressante contre d'autres bactéries pathogènes telles que *Citrobacter freundii* (30 mm), *Klebsiella pneumoniae* (30 mm), *Enterococcus faecalis* (25 mm), et *Listeria monocytogenes* (15 mm) (Darriet et al., 2012). En outre, Satrani et al. (2007) ont évalué l'effet antifongique de l'HE d'*O. mixta*, et ont rapporté la présence d'une activité antifongique remarquable contre *Trametes pini*, *Aspergillus niger* et *Penicillium parasiticus*. Le pouvoir inhibiteur de l'huile d'*O. mixta* peut être attribué à ses principaux constituants tels que le *p*-Menthane-1,8-diol et l'α-pinène et leurs groupes fonctionnels, ainsi qu'aux effets synergiques des composants mineurs et majeurs de cette HE (Burt, 2004; Jeddi et al., 2023b).

2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'activité antimicrobienne des HEs étudiées a été évaluée à l'aide de la méthode de microdilution en utilisant des microplaques à la résazurine, afin d'affirmer la capacité inhibitrice de ces huiles, indiquée par le test de diffusion sur disques.

En fait, la méthode de microdilution en milieu liquide constitue une technique quantitative permettant de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque échantillon (HE) testé. Le tableau 16 résume les résultats de CMIs obtenus pour les cinq souches étudiées.

Tableau 16. CMI des HEs étudiées vis-à-vis des souches testées.

Souches	CMI % (v/v)						
	HEs				Antibiotiques		
	E. polybractea	***O. mixta***	***L. burnatii***	***L. angustifolia***	**Gentamicin**	**Kanamycin**	**Fluconazole**
E. coli	2	6	1	1	16	32	NA
P. aeruginosa	1	8	2	4	32	64	NA
S. aureus	0,25	0,5	0,25	0,25	8	16	NA
B. cereus	0,125	1	0,125	0,25	8	32	NA
C. albicans	0,5	1	1	1	NA	NA	2

*NA : non appliqué. *Gentamicin, *Kanamycin* et Fluconazole ont été utilisés comme des contrôles positifs

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* a montré une activité inhibitrice importante vis-à-vis des cinq souches microbiennes testées. En fait, l'HE d'*E. polybractea* s'est avérée la plus efficace contre toutes les souches microbiennes testées, avec des valeurs de CMI allant de 1 % (v/v) à 2 % (v/v) pour les bactéries gram-négatives et de 0,25 % (v/v) à 0,125 % (v/v) pour les bactéries gram-positives. Les souches bactériennes *S. aureus* et *B. cereus* étaient les plus sensibles à l'HE d'*E. polybractea,* avec des CMIs de 0,25% (v/v) et 0,125% (v/v), respectivement. En revanche, *E. coli* a manifesté une résistance à cette HE, avec une valeur de CMI de 2 % (v/v). En outre, l'HE d'*E. polybractea* s'est avérée efficace contre *C. albicans* avec une CMI de 0,5 % (v/v). L'HE de *L. burnatii* possède également une activité inhibitrice relativement importante contre les souches testées.

Une sensibilité Gram-dépendante a été aussi observée, les bactéries gram-négatives étant plus résistantes que les bactéries gram-positives. En effet, les valeurs de CMIs de *S. aureus* et *B. cereus* variaient entre 0,25% (v/v) et 0,125%, tandis que celles de *E. coli* et *P. aeruginosa* dépassaient les 2%. En outre, un effet antifongique modeste a été observée par l'HE de *L. burnatii* vis-à-vis de *C. albicans*, avec une CMI de 1 % (v/v).

Par ailleurs, l'HE de *L. angustifolia* a présenté une activité inhibitrice remarquable contre les cinq souches étudiées, avec une CMI de 0,25 % (v/v) vis-à-vis de *B. cereus* et *S. aureus*, une CMI de 1% (v/v) contre *E. coli* et *C. albicans*, ainsi qu'une CMI de 4 % (v/v) contre *P. aeruginosa*. L'huile essentielle d'*O. mixta* a présenté les valeurs de CMIs les plus faibles vis-à-vis des cinq souches testées, en particulier contre *E. coli* (CMI=6% (v/v)) et *P. aeruginosa* (CMI= 8% (v/v)).

La détermination de la CMI des HEs examinées permet d'affirmer les résultats obtenus par le test de diffusion sur disque, dans lequel les bactéries à Gram$^-$ se sont révélées plus résistantes aux HEs testées que les Gram$^+$. Cela est dû aux différences structurales entre les parois cellulaires. En effet, les bactéries à Gram$^-$ possèdent une membrane externe constituée de chaînes de LPS. Cette couche crée une barrière de perméabilité hydrophile, limitant la diffusion de composés hydrophobes, tels que les HEs et leurs constituants bioactifs (Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2012; Nikaido, 2003, 1994). Il est à noter que les souches microbiennes ayant les plus grands diamètres d'inhibition ne sont pas forcément les plus sensibles selon la méthode de microdilution (Al-Mijalli et al., 2023a).

La pertinence de l'évaluation antimicrobienne effectuée dans cette investigation découle des résultats démontrant que les HEs examinées possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques exceptionnelles et compétitives par rapport aux antibiotiques de référence.

Aujourd'hui, la résistance microbienne constitue un problème majeur de santé publique mondial qui progresse très rapidement. Ce phénomène est dû à l'utilisation excessive et/ou inappropriée des antibiotiques (Muller et al., 2006). En effet, la résistance microbienne rend parfois le traitement thérapeutique inefficace, mettant le praticien dans des situations délicates, notamment lorsque la vie du malade est en cause (OMS, 2021). Ces événements manifestent le besoin urgent de développer et d'innover de nouveaux agents antimicrobiens à partir de sources alternatives, telles que les HEs. D'après la littérature, les HEs ont des propriétés antimicrobiennes puissantes contre une grande variété de micro-organismes pathogènes (Akthar et al., 2014; Hyldgaard et al., 2012).

Les résultats du test de microdilution des quatre HEs étudiées ont montré que les valeurs de CMI varient selon l'HE utilisée et la souche testée. Ainsi, la CMI de l'HE d'*E. polybractea* varie de 0,125% (v/v) contre *B. cereus* à 2% (v/v) contre *E. coli*.

Ces résultats confirment ceux d'Aldoghaim et ses collègues (2018), qui ont rapporté que l'HE extraite des feuilles d'*E. polybractea* a un effet significatif contre les bactéries à Gram$^+$, notamment *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus epidermidis.* Sharma et al. (2022) ont également démontré que l'HE d'*E. polybractea* avait le pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries Gram$^-$ telles que *E. coli* et *P. aeruginosa* à des CMIs très faibles. Une autre étude menée par Assaggaf et al. (2022) a révélé que l'huile d'*Eucalyptus* spp. possède une forte activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E. coli, Proteus mirabilis, Bacillus subtilis, S. aureus, Listeria monocytogenes* et *C. albicans*, avec des CMIs variant de 0,5 à 2 % (v/v).

Concernant l'HE de *L. burnatii,* la CMI varie de 0,125% (v/v) contre *B. cereus* à 2% (v/v) contre *P. aeruginosa*. Garzoli et al. (2019) ont montré que l'HE de *L. burnatii* provoque une forte inhibition des bactéries à $Gram^+$ (*Bacillus cereus* et *Kocuria marina*), tandis qu'une faible activité antibactérienne a été observée contre les bactéries à $Gram^-$, en particulier *Pseudomonas fluorescens* et *E. coli*. Cependant, l'HE de *L. burnatii* a aussi présenté un fort potentiel d'inhibition de la prolifération des bactéries Gram-, à savoir *E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium* et *Proteus mirabilis* (Walasek-Janusz et al., 2022). Une autre étude menée par Blažeković et al. (2018) a révélé que l'HE de *L. burnatii* possède une forte activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E. coli, Listeria monocytogenes, P. aeruginosa, Salmonella enteritidis, Kocuria rhizophila* ; *Candida albicans, C. glabrata et C. tropicalis*, avec des CMIs de 0,25 à 1 % (v/v).

Par ailleurs, la CMI de l'HE de *L. angustifolia* varie de 0,25% (v/v) contre *B. cereus* et *S. aureus* à 4 % (v/v) contre *P. aeruginosa*. En effet, ces résultats sont concordants avec ceux d'une étude antérieure démontrant l'efficacité de l'HE extraite des fleurs de *L. angustifolia* contre cinq souches microbiennes différentes, notamment *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, avec des valeurs CMI comprises entre 0,625 et 1,25 µg/µL (Danh et al., 2013). De plus, Lahkimi et al. (2020) ont également révélé que l'HE de *L. angustifolia* collectée de la région de Dayet Aoua avait le pouvoir d'inhiber la prolifération de *Bacillus subtilis, E. coli, S. aureus*, *Salmonella enterica* et *Botrytis cinerea* à des CMIs très faibles. Dans une autre étude, Moussii et ses collègues (2020) ont rapporté que l'HE de *L. angustifolia* collectée de la région Essaouira possède une activité antimicrobienne prometteuse contre *E. coli, S. aureus* et *P. aeruginosa*, avec des valeurs de CMIs de 3,33; 1,33 et 42 ,67 µl/mL, respectivement. De même, l'HE de *L. angustifolia* collectée du Moyen Atlas (Azrou) a également montré une activité intéressante contre d'autres bactéries pathogènes telles que *E. coli*, *Salmonella thyph, S. aureus, Enterobacter cloacae,* et *Acinetobacter baumanii* (Radi et al., 2022).

En ce qui concerne l'HE d'*O. mixta*, la CMI varie de 0,5% (v/v) contre *S. aureus* à 8% (v/v) contre *P. aeruginosa*. Ce qui corrobore avec les résultats de Chraibi et al. (2021) et Ouedrhiri et al. (2018), qui ont rapporté que les HEs extraites des fleurs d'*O. mixta* présentent une forte activité contre des bactéries à $Gram^+$ (*Bacillus subtilis* et *S. aureus*), tandis qu'un faible effet antibactérien a été observé contre les bactéries à $Gram^-$, notamment *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Une autre investigation a révélé que l'huile d'*O. mixta* possède une activité antimicrobienne prometteuse vis-à-vis de *Candida albicans*, *Citrobacter freundii, Enterococcus faecalis, E. coli, S. aureus, Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (Darriet et al., 2012).

La variabilité observée dans l'activité antimicrobienne des HEs étudiées peut être attribuée à leur polymorphisme chimique, qui est influencé par divers facteurs tels que le stade de croissance, le moment de la récolte, les conditions d'extraction et les variations climatiques (Houti et al., 2023). Ainsi, les propriétés antimicrobiennes des HEs testées peuvent être dues à la dominance de composés phytochimiques bioactifs appartenant au groupe des monoterpènes. En effet, ces molécules se caractérisent par leur effet sur la membrane plasmique des bactéries. Par exemple, le thymol, un phénol monoterpénique contenu dans l'HE de *Thymus vulgaris,* induirait des dommages membranaires et la libération de constituants intracellulaires (Kachur and Suntres, 2020). De même, l'eugénol, un phénol monoterpénique contenu dans l'HE du clou de girofle, perturbe la membrane cytoplasmique bactérienne en interagissant avec les bicouches phospholipidiques et en modifiant la fluidité de la membrane (Nazzaro et al., 2013). Ce qui suggère que les monoterpènes exercent leurs effets antimicrobiens en perturbant la fonction et l'intégrité de la membrane plasmique bactérienne. Cette perturbation de l'intégrité de la membrane conduit à la mort cellulaire ou à l'inhibition de la croissance bactérienne.

Dans notre étude, le pouvoir antimicrobien des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* peut être attribué à la dominance des constituants actifs monoterpéniques, tels que le 1,8-cinéole, *p*-cymène, linalol, l'acétate de linalyle et *p*-menthane-1,8-diol. En effet, Celiktas et al. (2007) et Balahbib et al. (2021) ont rapporté que 1,8-cinéole et le *p*-cymène, principaux composants de l'HE d'*E. polybractea* possèdent une activité antimicrobienne intéressante contre plusieurs microorganismes. Ces composés exercent leur effet antimicrobien en perturbant l'intégrité de la membrane des bactéries, ce qui entraîne une inhibition de la respiration et une altération de la perméabilité cellulaire (Brahim et al., 2015; Helander et al., 1998; Ultee et al., 2002).

Les HEs de *L. burnatii* et *L. angustifolia* sont caractérisées par la dominance du linalol, un alcool monoterpénique reconnu par son effet inhibiteur (Greay and Hammer, 2015; Hussain et al., 2008; Silva et al., 2015). Ce composé exerce son activité antimicrobienne en perturbant l'intégrité de la membrane. En effet, il augmente la perméabilité de la membrane cytoplasmique bactérienne, provoquant une fuite d'ions et de substances cellulaires (Greay and Hammer, 2015; Tampieri et al., 2005).

En ce qui concerne l'activité antibactérienne de l'HE d'*O. mixta*, nos résultats concordent avec ceux des études antérieures rapportant ses effets antimicrobiens, qui peuvent être principalement liés à son profile chimique, riche en p-menthane, α-pinène, et en germacrène D, capables d'inhiber la croissance bactérienne. En effet, Sivropoulou et al. (1995) ont démontré que l'effet antibactérien du p-menthane est attribué à la perturbation de la bicouche lipidique de la membrane bactérienne.

De même, l'α-pinène et le germacrène D, correspondant au deuxième et troisième composant majeur de l'HE d'*O. mixta*, facilitent la pénétration intracellulaire du p-menthane, renforçant ainsi son pouvoir antibactérien (Bassolé and Juliani, 2012; Hsouna et al., 2013; Ouedrhiri et al., 2018; Wang et al., 2012).

Néanmoins, il est difficile d'assigner l'effet d'un mélange complexe comme l'HE à un seul constituant. En effet, les constituants mineurs jouent un rôle crucial dans l'action antimicrobienne, peut-être en créant un effet de synergie avec d'autres constituants (Burt, 2004).

Le mécanisme d'action des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* n'a pas encore été élucidé. Néanmoins, il a été constaté que d'autres HEs possèdent de nombreux mécanismes antibactériens (Bajpai et al., 2013; Bouhdid et al., 2009; Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2012). En effet, les modes d'action antibactériens potentiels des HEs peuvent inclure : (1) la désintégration de la membrane externe bactérienne ou de la bicouche lipidique, (2) l'altération de la constitution en acides gras, (3) l'augmentation de la fluidité de la membrane entraînant une fuite d'ions potassium (K+) et de protons, (4) la perturbation de l'absorption du glucose et (5) l'inhibition de l'activité enzymatique ou de la lyse cellulaire (Burt, 2004; Cho et al., 2020).

Il a été révélé que les composés terpéniques interagissent avec les phospholipides et les protéines membranaires, entraînant l'inhibition de la chaîne respiratoire, l'interruption de la phosphorylation oxydative, la perturbation de la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), ainsi que la perte de métabolites (Angane et al., 2022; Togashi et al., 2010). D'autres auteurs ont suggéré que la membrane cellulaire pourrait être un site crucial pour l'inactivation de la cellule microbienne par des composés actifs (Gao et al., 2019). En effet, l'interaction entre les bactéries et les substances bioactives provoque l'épaississement de la paroi cellulaire des bactéries à Gram +, conduisant finalement à la rupture de la cellule (Silva and Domingues, 2017). D'autres molécules peuvent réagir avec la membrane externe chargée négativement de la cellule Gram -, facilitant l'entrée de la molécule dans l'espace intracellulaire, ce qui conduit à la rupture de la cellule (Silva et al., 2011).

3. Concentration minimale Fongicide (CMF) / Bactéricide (CMB)

L'analyse des résultats de la CMB (CMF) (tableau 17) a révélé que les huiles d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* avaient une activité antimicrobienne prometteuse vis-à-vis des cinq souches testées, avec des valeurs de CMB (CMF) allant de 0,25 à 32 % (v/v).

Tableau 17. Concentrations minimales bactéricides (CMB) et Concentrations minimales fongicides (CMF) des HEs étudiées.

Souches	CMB (CMF) % (v/v)			
	HEs			
	E. polybractea	***O. mixta***	***L. burnatii***	***L. angustifolia***
E. coli	2	12	1	8
P. aeruginosa	2	32	4	32
S. aureus	0,25	0,5	0,25	0,5
B. cereus	0,5	1	0,5	1
C. albicans	0,5	2	1	2

Les rapports CMB/CMI et CMF/CMI reflètent la capacité d'un composé (HE) à tuer ou à inhiber la croissance bactérienne ou fongique. Leur détermination permet de mieux comprendre le mode d'action des quatre HEs testées (tableau 18).

En effet, les agents antimicrobiens peuvent être considérés comme fongicides ou bactéricides lorsque le rapport CMF/CMI ou CMB/CMI ≤ 4,0 ; pour lequel il est réalisable d'atteindre des concentrations d'huile capables d'éliminer 99,99 % des souches microbiennes testées. En revanche, lorsque ces rapports dépassent 4,0 (> 4,0), il peut devenir difficile d'apporter des quantités suffisantes de l'HE testée pour éliminer 99,99% des micro-organismes, et l'échantillon (HE) est donc considéré comme fongistatique ou bactériostatique (Abdallah, 2016; Davis, 2018). Dans notre étude, les rapports CMF/CMI et CMB/CMI contre les cinq souches examinées n'ont pas dépassé 4,0 (≤ 4,0), à l'exception contre les souches *E. coli* et de *P. aeruginosa* dans le cas de l'HE de *L. angustifolia*, où le rapport CMB/CMI était égal à 8. Ce qui indique que les HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* possèdent des propriétés fongicides et bactéricides.

Dans la littérature, l'effet microbicide de l'HE d'*E. polybractea* a été déjà démontré contre dix souches microbiennes, dont quatre bactéries à Gram$^-$ (*E. coli, P. aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Salmonella enterica*), cinq Gram$^+$ (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* NCTC 10442, *Staphylococcus epidermidis*), et une souche fongique, à savoir *C. albicans* ATCC 90028 (Aldoghaim et al., 2018). De plus, Assaggaf et al. (2022) ont révélé une action bactéricide de l'HE d'*Eucalyptus* spp. contre *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis, B. subtilis, Salmonella enterica* et *S. aureus*.

L'HE de *L. burnatii* s'est avérée bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées. Ces résultats concordent avec une étude antérieure qui a signalé des rapports CMB/CMI compris entre 1 et 4 pour cette huile contre *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Acinetobacter bohemicus* (Garzoli et al., 2019). Blažeković et al. (2018) ont également démontré un effet bactéricide de l'huile de *L. burnatii* contre neuf souches bactériennes, dont cinq sont des bactéries à Gram - (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca*) et quatre sont des bactéries à Gram + (*Streptococcus pyogenes, S. aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus*).

Par ailleurs, l'HE *de L. angustifolia* a été considérée comme un agent bactéricide plus qu'un agent bactériostatique contre diverses souches bactériennes, telles que *E. coli*, *S. aureus, P. aeruginosa* (Moussi Imane et al., 2017; Moussii et al., 2020). De même, Slimani et al. (2022) ont aussi prouvé l'huile de *L. angustifolia* a un effet bactéricide contre *E. coli, S. aureus, Enterococcus faecalis* et *P. aeruginosa*. Concernant l'HE d'*O. mixta,* Chraibi et al. (2021) ont montré un effet bactéricide contre *E. coli* et *S. aureus.* Par ailleurs, Darriet et ses collègues (2012) ont révélé une action microbicide de l'HE d'*O. mixta* vis-à-vis de neuf souches microbiennes, dont cinq sont des bactéries à Gram - (*E. coli, Enteroccocus faecalis, P. aeruginosa, Klebsiella pneumoniae Citrobacter freundii*) et trois sont des bactéries à Gram + (*S. aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes*), ainsi qu'une souche fongique, à savoir *C. albicans*.

En résumé, cette investigation montre que les HEs testées ont un effet antimicrobien intéressant contre des souches microbiennes. En outre, l'efficacité *in vitro* peut être expliquée par la richesse des quatre HEs étudiées en molécules bioactives. Ce qui permet de mettre en exergue l'utilisation potentielle des HEs étudiées en tant qu'alternatives aux antibiotiques conventionnels, qui deviennent de plus en plus inefficaces contre certaines souches résistantes. Dans ce sens, il serait également pertinent de compléter cette étude par d'autres plus approfondies et des tests in situ.

Tableau 18. Effet Bactériostatique-Fongistatique/ Bactéricide-Fongicide des HEs étudiées.

Microorganisms	*E. polybractea*		*O. mixta*		*L. burnatii*		*L. angustifolia*	
	CMB(CMF) / CMI	**Effet**	**CMB(CMF) /CMI**	**Effet**	**CMB(CMF)/CMI**	**Effet**	**CMB(CMF)/ CMI**	**Effet**
E. coli	1	Bactéricide	2	Bactéricide	1	Bactéricide	8	Bactériostatique
P. aeruginosa	2	Bactéricide	4	Bactéricide	2	Bactéricide	8	Bactériostatique
S. aureus	1	Bactéricide	1	Bactéricide	1	Bactéricide	2	Bactéricide
B. cereus	4	Bactéricide	1	Bactéricide	4	Bactéricide	4	Bactéricide
C. albicans	1	Fongicide	2	Fongicide	1	Fongicide	2	Fongicide

4. Activité antimicrobienne : Concentration inhibitrice fractionnaire et indice de concentration inhibitrice fractionnaire

Les résultats de l'effet antimicrobien des six combinaisons des HEs contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans* sont présentés dans les tableaux (19, 20, 21, 22, 23 et 24).

En commençant par le mélange N°1 (*E. polybractea / O. mixta*) tel que présenté dans le tableau 19, les valeurs de l'ICIF varient de 0,141 à 1,062. Concernant la souche *E. coli*, une seule combinaison ($^{1/4}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$) a permis de réduire la CMI d'*E. polybractea* de 2 % à 0,5 % (v/v) et la CMI d'*O. mixta* de 6 % à 1,5 % (v/v). Cette combinaison a montré une activité antibactérienne synergique avec un ICIF de 0,500. Cependant, les combinaisons ($^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$ et $^{1/4096}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$) ont présenté une synergie partielle avec un ICIF de 0,625 et 0,5002, respectivement. En revanche, les trois combinaisons (CMI $_{E.\ polybractea}$+ $^{1/64}$ CMI $_{O.\ mixta}$, CMI $_{E.\ polybractea}$+ $^{1/32}$ CMI $_{O.\ Mixta}$ et CMI $_{E.\ polybractea}$+ $^{1/16}$ CMI $_{O.\ Mixta}$) ont montré un effet indifférent contre *E. coli* avec un ICIF de 1,015, 1,031 et 1,062, respectivement.

En ce qui concerne l'effet combiné des HEs étudiées contre *S. aureus*, les résultats ont montré que quatre combinaisons ($^{1/4}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/32}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/8}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/16}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/32}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$ et $^{1/64}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$) ont produit un effet antibactérien synergique avec des ICIF de 0,281, 0,187, 0,156 et 0,265 respectivement. Les combinaisons $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/64}$ CMI $_{O.\ mixta}$ et $^{1/256}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$ ont également présenté une synergie partielle avec des ICIF de 0,516 et 0,504, respectivement.

En outre, le mélange binaire entre $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/64}$ CMI $_{O.\ mixta}$ a présenté un effet synergique partiel contre *C. albicans,* avec un ICIF de 0,515, tandis que les combinaisons ($^{1/4}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/32}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/8}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/16}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/64}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/512}$CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$ et $^{1/1024}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$) ont montré une activité inhibitrice (synergie) sur la croissance de *C. albicans,* avec des ICIF de 0,281 ; 0,187 ; 0,141 ; 0,252 et 0,500 respectivement.

Tableau 19. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°1 (*E. polybractea* / *O. mixta*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*.

Souches microbiennes		HEs	CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/1	*E. polybractea*	2	2	1	1,015	Indifférent
	1/64	*O. mixta*	6	0,09375	0,01562		
	1/1	*E. polybractea*	2	2	1	1,031	Indifférent
	1/32	*O. mixta*	6	0,1875	0,03125		
	1/1	*E. polybractea*	2	2	1	1,062	Indifférent
	1/16	*O. mixta*	6	0,375	0,0625		
	1/2	*E. polybractea*	2	1	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*O. mixta*	6	0,75	0,125		
	1/4	*E. polybractea*	2	0,5	0,25	0,500	Synergie
	1/4	*O. mixta*	6	1,5	0,25		
	1/4096	*E. polybractea*	2	0,00048828	0,00024414	0,5002	Synergie partielle
	1/2	*O. mixta*	6	3	0,5		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/2	*E. polybractea*	0,25	0,125	0,5	0,516	Synergie partielle
	1/64	*O. mixta*	0,5	0,007813	0,015625		
	1/4	*E. polybractea*	0,25	0,0625	0,25	0,281	Synergie
	1/32	*O. mixta*	0,5	0,0156	0,03125		
	1/8	*E. polybractea*	0,25	0,03125	0,125	0,187	Synergie
	1/16	*O. mixta*	0,5	0,03125	0,0624		
	1/32	*E. polybractea*	0,25	0,007813	0,03125	0,156	Synergie
	1/8	*O. mixta*	0,5	0,0625	0,125		
	1/64	*E. polybractea*	0,25	0,003906	0,0156	0,265	Synergie
	1/4	*O. mixta*	0,5	0,125	0,25		
	1/256	*E. polybractea*	0,25	0,000976	0,003906	0,504	Synergie partielle
	1/2	*O. mixta*	0,5	0,25	0,5		
C. albicans	1/2	*E. polybractea*	0,5	0,25	0,5	0,515	Synergie partielle
	1/64	*O. mixta*	1	0,01562	0,01526		
	1/4	*E. polybractea*	0,5	0,125	0,25	0,281	Synergie
	1/32	*O. mixta*	1	0,03125	0,03125		
	1/8	*E. polybractea*	0,5	0,0625	0,125	0,187	Synergie
	1/16	*O. mixta*	1	0,0625	0,0626		
	1/64	*E. polybractea*	0,5	0,0078125	0,015625	0,141	Synergie
	1/8	*O. mixta*	1	0,125	0,125		
	1/512	*E. polybractea*	0,5	0,00097652	0,0019531	0,252	Synergie
	1/4	*O. mixta*	1	0,25	0,25		
	1/1024	*E. polybractea*	0,5	0,00048828125	0,000976562	0,500	Synergie
	1/2	*O. mixta*	1	0,5	0,5		

Les résultats de l'activité antimicrobienne du mélange N°2 (*E. polybractea* / *L. angustifolia*) sont représentés dans le tableau 20. Les valeurs calculées de l'ICIF étaient comprises entre 0,250 et 1,032 ; indiquant trois types d'interactions entre l'HE d'*E. polybractea* et celle de *L. angustifolia*. En outre, la combinaison ($^{1/4}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/8}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$) a montré un effet synergique remarquable contre *E. coli* avec un ICIF de 0,375. Par ailleurs, deux autres combinaisons, à savoir $^{1/8}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ et $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/16}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ ont manifesté une activité inhibitrice vis-à-vis la souche testée, avec des valeurs d'ICIF de 0,625 et 0,562 (> 0,5), montrant une synergie partielle. Concernant l'impact de l'application combinée des HEs d'*E. polybractea* et de *L. angustifolia* contre *S. aureus*, il a été constaté que les mélanges de $^{1/8}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/2}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$, $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/16}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ et $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/8}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ ont présenté une action antibactérienne synergique partielle avec des ICIF de 0,625 ; 0,562 ; 0,625, respectivement. En revanche, la combinaison ($^{1/4}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$) induit un effet synergique envers la souche testée, avec un ICIF de 0,5. Les autres mélanges ont donné soit un effet indifférent soit un effet additif.

En outre, l'effet combiné des HEs examinées contre *C. albicans* a révélé que la combinaison $^{1/2}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/16}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ avait un effet synergique partiel, avec un ICIF de 0,562, tandis que les combinaisons $^{1/8}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ +$^{1/8}$CMI $_{L.\ angustifolia}$ et $^{1/64}$ CMI $_{E.\ polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ ont montré un effet inhibiteur (synergie) vis-à-vis la souche de *C. albicans*, avec des valeurs d'ICIF de 0,250, 0,266, respectivement. L'autre combinaison a maintenu l'effet inhibiteur avec un ICIF de 1,032, ce qui montre l'absence d'interaction.

Tableau 20. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°2 (*E. polybractea / L. angustifolia*) contre les souches *E. coli, S. aureus et C. albicans.*

Souches microbiennes	HEs		CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/8	*E. polybractea*	2	0,25	0,125	0,625	Synergie partielle
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5		
	1/4	*E. polybractea*	2	0,5	0,25	0,375	Synergie
	1/8	*L. angustifolia*	1	0,125	0,125		
	1/2	*E. polybractea*	2	1	0,5	0,562	Synergie partielle
	1/16	*L. angustifolia*	1	0,0625	0,0625		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/1	*E. polybractea*	0,25	0,25	1	1,031	Indifférent
	1/32	*L. angustifolia*	0,25	0,0078	0,0312		
	1/2	*E. polybractea*	0,25	0,125	0,5	0,562	Synergie partielle
	1/16	*L. angustifolia*	0,25	0,0156	0,0624		
	1/2	*E. polybractea*	0,25	0,125	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*L. angustifolia*	0,25	0,03125	0,1248		
	1/4	*E. polybractea*	0,25	0,0625	0,25	0,5	Synergie
	1/4	*L. angustifolia*	0,25	0,0625	0,25		
	1/8	*E. polybractea*	0,25	0,03125	0,125	0,625	Synergie partielle
	1/2	*L. angustifolia*	0,25	0,125	0,5		
	1/2048	*E. polybractea*	0,25	0,0001220	0,0004882	1	Additif
	1/1	*L. angustifolia*	0,25	0,25	1		
C. albicans	1/1	*E. polybractea*	0,5	0,5	1	1,032	Indifférent
	1/32	*L. angustifolia*	1	0,03125	0,03125		
	1/2	*E. polybractea*	0,5	0,25	0,5	0,562	Synergie partielle
	1/16	*L. angustifolia*	1	0,0625	0,0625		
	1/8	*E. polybractea*	0,5	0,0625	0,125	0,250	Synergie
	1/8	*L. angustifolia*	1	0,125	0,125		
	1/64	*E. polybractea*	0,5	0,0078125	0,15625	0,266	Synergie
	1/4	*L. angustifolia*	1	0,25	0,25		
	1/256	*E. polybractea*	0,5	0,001953125	0,00390625	0,504	Synergie partielle
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5		

Le mélange N°3 (*E. polybractea* / *L. burnatii*) a également présenté des effets synergiques très remarquables contre *E. coli, S. aureus,* et *C. albicans*. Les valeurs de l'ICIF de la combinaison des deux HEs testées varient de 0,065 à 1,062 (Tableau 21). En effet, deux combinaisons ($^{1/2}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/4096}$ CMI $_{L. burnatii}$ et $^{1/4}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/512}$ CMI $_{L. burnatii}$) ont révélé des interactions antibactériennes synergiques contre *E. coli,* avec des valeurs d'ICIF de 0,50 et 0,252, tandis que la combinaison des HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii* a montré une synergie partielle (ICIF = 0,625) lorsqu'elles étaient combinées à des concentrations de $^{1/8}$ CMI $_{E. polybractea}$ et $^{1/2}$ CMI $_{L. burnatii}$. Ainsi, les autres mélanges ont maintenu leur impact inhibiteur avec un ICIF de 1,015, 1,032 et 1,062, ce qui témoigne l'absence d'interaction.

L'effet combiné binaire entre les HEs étudiées contre *S. aureus,* a révélé que les combinaisons ($^{1/2048}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L. burnatii}$ et $^{1/4096}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{L. burnatii}$) avaient un effet antibactérien synergique avec des valeurs d'ICIF de 0,250 et 0,500, alors que la combinaison ($^{1/4096}$ CMI $_{E. polybractea}$ + CMI $_{L. burnatii}$) a induit un effet additif avec un ICIF de 1. De plus, le traitement combiné des HEs contre *C. albicans*, a montré que toutes les combinaisons testées ($^{1/4}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/64}$ CMI $_{L. burnatii}$, $^{1/16}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/32}$ CMI $_{L. burnatii}$, $^{1/512}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/16}$ CMI $_{L. burnatii}$, $^{1/4096}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/8}$ CMI $_{L. burnatii}$, $^{1/4096}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L. burnatii}$ et $^{1/4096}$ CMI $_{E. polybractea}$ + $^{1/2}$ CMI $_{L. burnatii}$) ont révélé une activité inhibitrice (synergie) vis-à-vis de la souche testée, avec des valeurs d'ICIF de 0,265, 0,094, 0,065, 0,125, 0,250 et 0,500, respectivement.

Les résultats de l'action antimicrobienne du mélange N°4 (*L. angustifolia* /*O. mixta*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans* sont présentés dans le tableau 22. Ces résultats montrent une activité antimicrobienne remarquable, représentée par quatre combinaisons ayant un effet synergique partiel ($0,5 > ICIF \leq 0,75$) contre *E. coli* et *C. albicans*. Deux de ces combinaisons, à savoir $^{1/2}$ CMI $_{L. angustifolia}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O. mixta}$, et $^{1/16}$ CMI $_{L. angustifolia}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O. mixta}$, se sont révélées efficaces contre *E. coli*, tandis que les combinaisons de $^{1/2}$ CMI $_{L. angustifolia}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O. mixta}$ et $^{1/64}$ CMI $_{L. angustifolia}$+ $^{1/2}$ CMI $_{O. mixta}$ ont démontré un effet anti-*Candida* importants. En outre, une seule combinaison ($^{1/16}$ CMI $_{L. angustifolia+}$ $^{1/4}$ CMI $_{O. mixta}$) a réduit la CMI des deux HEs de 1 % à 0,0625% et 0,25 % (v/v), respectivement, contre *C. albicans*. Cette combinaison a révélé un effet synergique envers la souche testée, avec un ICIF de 0,312. De plus, trois effets indifférents ont été détectés (CIF de 1,25 et 1,063), ainsi qu'un effet additif (ICIF=1) chez *S. aureus*.

Tableau 21. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°3 (*E. polybractea / L. burnatii*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*.

Souches microbiennes		HEs	CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/64	*E. polybractea*	2	0,03125	0,01562	1,015	Indifférent
	1/1	*L. burnatii*	1	1	1		
	1/32	*E. polybractea*	2	0,0625	0,03125	1,032	Indifférent
	1/1	*L. burnatii*	1	1	1		
	1/16	*E. polybractea*	2	0,125	0,0625	1,062	Indifférent
	1/1	*L. burnatii*	1	1	1		
	1/8	*E. polybractea*	2	0,25	0,125	0.625	Synergie partielle
	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5		
	1/4	*E. polybractea*	2	0,5	0,25	0.252	Synergie
	1/512	*L. burnatii*	1	0,00195313	0,00195313		
	1/2	*E. polybractea*	2	1	0,5	0.500	Synergie
	1/4096	*L. burnatii*	1	0,00024414	0,00024414		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/2048	*E. polybractea*	0.25	0,0001220	0,00048828	0.250	Synergie
	1/4	*L. burnatii*	0.25	0,0625	0,25		
	1/4096	*E. polybractea*	0.25	$6{,}103.10^{-5}$	0,00024412	0.500	Synergie
	1/2	*L. burnatii*	0.25	0,125	0,5		
	1/4096	*E. polybractea*	0.25	$6{,}103.10^{-5}$	0,00024412	1	Additif
	1	*L. burnatii*	0.25	0,25	1		
C. albicans	1/4	*E. polybractea*	0,5	0,125	0,25	0,265	Synergie
	1/64	*L. burnatii*	1	0,01562	0,01562		
	1/16	*E. polybractea*	0,5	0,03125	0,0625	0,094	Synergie
	1/32	*L. burnatii*	1	0,03125	0,0312		
	1/512	*E. polybractea*	0,5	0,000976562	0,0019531	0,065	Synergie
	1/16	*L. burnatii*	1	0,0625	0,0625		
	1/4096	*E. polybractea*	0,5	0,0001220703	0,0002441406	0,125	Synergie
	1/8	*L. burnatii*	1	0,125	0,125		
	1/4096	*E. polybractea*	0,5	0,0001220703	0,0002441406	0,250	Synergie
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25		
	1/4096	*E. polybractea*	0,5	0,0001220703	0,0002441406	0,500	Synergie
	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5		

Tableau 22. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°4 (*L. angustifolia /O. mixta*) contre les souches *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*.

Souches microbiennes	HEs		CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5	0,750	Synergie partielle
	1/4	*O. mixta*	6	1,5	0,25		
	1/16	*L. angustifolia*	1	0,0625	0,0625	0,562	Synergie partielle
	1/2	*O. mixta*	6	3	0,5		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/4	*L. angustifolia*	0,25	0,0625	0,25	1,25	Indifférent
	1/1	*O. mixta*	0,5	0,5	1		
	1/2	*L. angustifolia*	0,25	0,125	0,5	1	Additif
	1/2	*O. mixta*	0,5	0,25	0,5		
	1/1	*L. angustifolia*	0,25	0,25	1	1,25	Indifférent
	1/4	*O. mixta*	0,5	0,125	0,25		
C. albicans	1/1	*L. angustifolia*	1	1	1	1,063	Indifférent
	1/16	*O. mixta*	1	0,0625	0,0625		
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*O. mixta*	1	0,125	0,125		
	1/16	*L. angustifolia*	1	0,0625	0,0625	0,312	Synergie
	1/4	*O. mixta*	1	0,25	0,25		
	1/64	*L. angustifolia*	1	0,01562	0,01562	0,516	Synergie partielle
	1/2	*O. mixta*	1	0,5	0,5		

Le tableau 23 répertorie les résultats de l'interaction entre les HEs d'*O. mixta* et de *L. burnatii* (mélange 5) vis-à-vis des souches microbiennes examinées. Les valeurs de l'ICIF varient entre 0,132 et 1,062, révélant 15 combinaisons différentes produisant un effet synergique, synergique partielle et indifférent. Parmi ces combinaisons ($^{1/4}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$), ($^{1/128}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/256}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/1024}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$) et ($^{1/4}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/32}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/4}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/16}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/8}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$ et $^{1/32}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/4}$ CMI $_{O.\ mixta}$, $^{1/128}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$) ont montré un effet antimicrobien synergique (ICIF ≤ 0,5) contre *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*, respectivement.

Tableau 23. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°5 (*L. burnatii / O. mixta) contre les souches E. coli, S. aureus* et *C. albicans.*

Souches microbiennes		HEs	CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/1	*L. burnatii*	1	1	1	1,015	Indifférent
	1/62	*O. mixta*	6	0,09375	0,015625		
	1/1	*L. burnatii*	1	1	1	1,031	Indifférent
	1/32	*O. mixta*	6	0,1875	0,03125		
	1/1	*L. burnatii*	1	1	1	1,062	Indifférent
	1/16	*O. mixta*	6	0,375	0,0625		
	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*O. mixta*	6	0,75	0,125		
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25	0,500	Synergie
	1/4	*O. mixta*	6	1,5	0,25		
	1/16	*L. burnatii*	1	0,0625	0,0625	0,562	Synergie partielle
	1/2	*O. mixta*	6	3	0,5		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/128	*L. burnatii*	0,25	0,001953	0,0078	0,132	Synergie
	1/8	*O. mixta*	0,5	0,0625	0,125		
	1/256	*L. burnatii*	0,25	0,000976	0,003904	0,254	Synergie
	1/4	*O. mixta*	0,5	0,125	0,25		
	1/1024	*L. burnatii*	0,25	0,0002441	0,000976	0,500	Synergie
	1/2	*O. mixta*	0,5	0,25	0,5		
C. albicans	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5	0,516	Synergie partielle
	1/64	*O. mixta*	1	0,01562	0,01562		
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25	0,282	Synergie
	1/32	*O. mixta*	1	0,03125	0,03125		
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25	0,312	Synergie
	1/16	*O. mixta*	1	0,0625	0,0625		
	1/8	*L. burnatii*	1	0,125	0,125	0,250	Synergie
	1/8	*O. mixta*	1	0,125	0,125		
	1/32	*L. burnatii*	1	0,03125	0,03125	0,281	Synergie
	1/4	*O. mixta*	1	0,25	0,25		
	1/128	*L. burnatii*	1	0,0078125	0,0078125	0,50	Synergie
	1/2	*O. mixta*	1	0,5	0,5		

De plus, trois autres combinaisons ($^{1/2}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/8}$ CMI $_{O.\ mixta}$,$^{1/16}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/2}$ CMI $_{O.\ mixta}$) et ($^{1/2}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ + $^{1/64}$ CMI $_{O.\ mixta}$), ont également montré un potentiel de synergie partielle contre *E. coli* et *C. albicans*, avec des valeurs d'ICIF de 0,625 ; 0,562, 0,516, respectivement. Les autres mélanges ont maintenu leur effet inhibiteur sur la croissance d'*E. coli*, avec des ICIF de 1,015, 1,031 et 1,062, indiquant l'absence d'interaction.

En ce qui concerne l'effet de l'application combinée des HEs de *L. angustifolia* et de *L. burnatii* (mélange 6) contre les souches microbiennes sélectionnées (tableau 24), les valeurs de l'ICIF varient de 0,375 à 1,125. Ainsi, seulement deux combinaisons ($^{1/4}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ et $^{1/8}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/4}$ CMI $_{L.\ burnatii}$) ont montré un effet synergique contre les souches *E. coli* et *C. albicans*, avec des ICIF de 0,500 et 0,375, respectivement. En revanche, cinq autres combinaisons, à savoir $^{1/2}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/8}$ CMI $_{L.\ burnatii}$, $^{1/512}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/2}$ CMI $_{L.\ burnatii}$ et $^{1/2}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/16}$ CMI $_{L.\ burnatii}$, $^{1/2}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/8}$ CMI $_{L.\ burnatii}$, $^{1/512}$ CMI $_{L.\ angustifolia}$ + $^{1/2}$ CMI $_{L.\ burnatii}$, ont révélé un effet antimicrobien partiellement synergique contre ces deux souches, avec des ICIF de 0,625, 0,502, 0,562, et 0,625. En outre, deux combinaisons ont manifesté un effet indifférent contre *S. aureus* avec des ICIF comprises entre 1,0 et 4,0.

Dans cette étude, l'activité antimicrobienne de six mélanges binaires d'HEs a été testée. Le premier mélange composé des HEs d'*E. polybractea* et d'*O. mixta* a montré des synergies et des synergies partielles sur toutes les souches testées, sauf trois effets indifférents contre *E. coli*. En outre, le deuxième mélange (*E. polybractea* / *L. angustifolia*) et le troisième mélange (*E. polybractea* / *L. burnatii*) ont été également actifs sur les trois souches sélectionnées, présentant des effets synergiques et synergiques partielles, à l'exception d'un effet indifférent et d'un effet additif contre *S. aureus* et *C. albicans* (mélange 2) ainsi que trois effets indifférents contre *E. coli* (mélange 3). Le quatrième mélange a été composé de *L. angustifolia* et d'*O. mixta*. Le mélange de ces deux huiles n'était actif que sur *E. coli* et *C. albicans*, montrant quatre synergies partielles et un effet synergique. Concernant le cinquième mélange (*L. burnatii*/ *O. mixta*), il a révélé des effets synergiques et synergiques partielles contre les souches microbiennes testées, à l'exception de trois effets indifférents contre *E. coli*. En revanche, le sixième mélange était composé de *L. angustifolia* et de *L. burnatii*. Le mélange de ces deux huiles a généré des effets synergiques, synergiques partielles et indifférents, selon les concentrations utilisées. Au total, 61 formulations ont possédé un effet antimicrobien meilleur que celui de l'HE seule.

Tableau 24. Détermination du CIF, ICIF et résultats des interactions du mélange N°6 (*L. angustifolia / L. burnatii) contre les souches E. coli, S. aureus* et *C. albicans.*

Souches microbiennes		HEs	CMI%(v/v)		CIF % (v/v)	ICIF	Effet
			Seule	Combinaison			
***E. coli* ATCC 25922**	1/1	*L. angustifolia*	1	1	1	1,062	Indifférent
	1/16	*L. burnatii*	1	0,0625	0,0625		
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*L. burnatii*	1	0,125	0,125		
	1/4	*L. angustifolia*	1	0,25	0,25	0,500	Synergie
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25		
	1/512	*L. angustifolia*	1	0,0019531	0,0019531	0,502	Synergie partielle
	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5		
***S. aureus* ATCC 29213**	1/2	*L. angustifolia*	0,25	0,125	0,5	1,500	Indifférent
	1/1	*L. burnatii*	0,25	0,25	1		
	1/1	*L. angustifolia*	0,25	0,25	1	1,125	Indifférent
	1/8	*L. burnatii*	0,25	0,03125	0,125		
C. albicans	1/1	*L. angustifolia*	1	1	1	1,032	Indifférent
	1/32	*L. burnatii*	1	0,03125	0,03125		
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5	0,562	Synergie partielle
	1/16	*L. burnatii*	1	0,0625	0,0625		
	1/2	*L. angustifolia*	1	0,5	0,5	0,625	Synergie partielle
	1/8	*L. burnatii*	1	0,125	0,125		
	1/8	*L. angustifolia*	1	0,125	0,125	0,375	Synergie
	1/4	*L. burnatii*	1	0,25	0,25		
	1/512	*L. angustifolia*	1	0,001953125	0,001953125	0,502	Synergie partielle
	1/2	*L. burnatii*	1	0,5	0,5		

En résumé, les effets antimicrobiens combinés mis en évidence par le calcul de l'ICIF contre *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* ont montré des résultats antimicrobiens synergiques, partiellement synergiques, indifférents ou additifs, qui pourraient améliorer l'effet produit par chaque HE seule. Cela peut être principalement dû aux interactions entre les constituants majeurs et/ou mineurs des HEs combinées (Ouedrhiri et al., 2017). Dans la littérature, l'efficacité antimicrobienne accrue des HEs combinées a été attribuée à la synergie entre les composés majeurs tels que l'eugénol et le thymol avec le linalol ou le menthol (Bassolé et al., 2010). En outre, il a été suggéré que l'activité antimicrobienne des composants majeurs pourrait être modulée par les composants mineurs, contribuant ainsi à l'effet interactif final de la combinaison (Delaquis et al., 2002; Ouedrhiri et al., 2017). Des études antérieures ont montré que la combinaison du 1,8-cinéole avec des hydrocarbures terpéniques, tels que le limonène (Vuuren and Viljoen, 2007), le p-cymène et/ou le Carvacrol (Pina-Vaz et al., 2004), produit des effets antibactériens synergiques et additifs, respectivement.

Il a été également rapporté qu'il y a un effet synergique entre les HEs d'*O. mixta*, d'*Eucalyptus* et de *Lavandula* avec les HEs d'autres espèces (Chraibi et al., 2021; Hashemi and Jafarpour, 2020; Moussii et al., 2020; Ouedrhiri et al., 2018; Vieira et al., 2017). En effet, Hashemi and Jafarpour, (2020) ont rapporté les effets de la combinaison binaire des HEs d'*Eucalyptus* et de *Dracocephalum*. Leurs résultats ont révélé des effets synergiques sur l'inhibition de *B. cereus, S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (ICIF ≤0,5), tandis que contre *E. coli, P. aeruginosa, Salmonella typhi*, et *Shigella flexneri* ils ont montré un effet aditif (0,5 < ICIF ≤ 1) (). En revanche, une activité synergique et partiellement synergique a été observée entre les HEs d'*O. mixta* et de *Pelargonium asperum* vis-à-vis de *S. aureus* (Ouedrhiri et al., 2018). En outre, Moussii et al. (2020) ont montré que la combinaison des HEs de *L. angustifolia*, d'*Artemisia herba-alba*, et de *Rosmarinus officinalis* avait un effet synergique contre *E. coli, S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Dans la présente étude, la combinaison de chaque paire d'HEs à une certaine concentration a révélé un effet antimicrobien synergique et supérieur à leur application individuelle contre les trois souches testées. Ce résultat pourrait être dû à une interaction synergique entre les différents composés majoritaires, notamment à l'interaction entre les monoterpènes oxygénés et les hydrocarbures monoterpéniques (Ultee et al., 2002).

Cet effet synergique entre les HEs étudiées pourrait s'expliquer aussi par la capacité des hydrocarbures, tels que le p-cymène, l'α-pinène, le γ-terpinène, limonène et le germacrène, qui sont les composés des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii et* de *L. angustifolia*, à intégrer et perturber la membrane cellulaire, facilitant ainsi la pénétration des composés actifs (1,8-cinéole, linalol, p-Menthane-1,8-diol, camphre, et le bornéol), ce qui conduit à la lyse cellulaire.

Ultee et al. (2002) ont montré un effet synergique entre le p-cymène et le carvacrol, suggérant que cet effet se produit lorsque le p-cymène perturbe les membranes bactériennes, ce qui facilite probablement l'entrée du carvacrol dans la cellule où il exerce son action. En outre, Burt (2004) a signalé que l'effet synergique ou additif entre deux HEs pourrait être attribué à des interactions entre les composants mineurs qui peuvent jouer un rôle crucial dans les activités antimicrobiennes des mélanges.

Il a également été confirmé que les combinaisons de 1,8-cinéole/limonène, 1,8-cinéole/p-cymène, α-pinène/linalol, 1,8-cinéole/ Carvacrol, α-pinene/limonene, carvacrol/linalool, et carvacrol/p-cymène, présentent une interaction synergique ou additive contre différentes souches microbiennes (Bassolé and Juliani, 2012; De Azeredo et al., 2011; Pina-Vaz et al., 2004; Tserennadmid et al., 2011; Vuuren and Viljoen, 2007), ce qui pourrait s'expliquer par leurs structures et mécanismes d'action différents (Adrar et al., 2016; Sadiki et al., 2014). Van Vuuren et al. (2009) ont rapporté que les composés, qui ont des structures similaires ou agissent avec le même mécanisme d'action, présentent un effet indifférent ou additif envers des micro-organismes, lorsqu'ils sont combinés. De plus, il a été montré que le type d'interaction entre les HEs dépend de la proportion des deux composants combinés.

Même si de nombreux chercheurs se sont concentrés sur l'activité antimicrobienne des HEs, leur mécanisme d'action n'a pas encore été entièrement compris. Néanmoins, il existe certains mécanismes d'interaction antimicrobienne généralement acceptés qui produisent un résultat synergique, y compris la modulation de certaines voies biochimiques communes, l'inhibition des enzymes protectrices, et l'interaction des antimicrobiens avec la paroi cellulaire, ce qui améliore l'absorption d'autres antimicrobiens (Hyldgaard et al., 2012; Santiesteban-López et al., 2007). Il est également possible que les antimicrobiens aient des modes d'action différents, attaquant ainsi nombreux sites différents sur ou dans la cellule, qui dépendent indirectement les uns des autres.

Pris ensemble, ces découvertes renforcent la suggestion selon laquelle le mélange de ces HEs à des concentrations suffisamment faibles pourrait constituer une alternative prometteuse aux agents antimicrobiens et aux conservateurs synthétiques, qui deviennent de plus en plus inefficaces contre un éventail de souches microbiennes responsables d'infections graves et des détériorations indésirables de certains produits alimentaires (Jeddi et al., 2023b; Sadiki et al., 2014). Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étudier les principaux composants des HEs et mieux comprendre leur mode d'action en vue de les utiliser comme conservateurs alimentaires.

Ces résultats nous ont incités et encouragés à optimiser cette activité, à trouver une combinaison ternaire ayant un effet antimicrobien optimal, et à étudier et identifier d'éventuelles corrélations entre les activités observées et les composés majoritaires des HEs et de leurs mélanges. Ce travail sera l'objet de la section suivante et a été réalisé à l'aide de méthodes statistiques, à savoir le plan d'expériences et le test ANOVA.

III. Formulation par le plan de mélange : activités antibactériennes

1. Plan d'expérimentation

Le plan de mélange comprenant les diverses combinaisons des trois composantes testées, à savoir les HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE*)* et *L. burnatii* (LBHE), ainsi que les réponses observées de chaque expérience vis-à-vis de *S. aureus, E. coli* et *C. albicans*, est représenté dans le tableau 25. Les essais ont été randomisés, et chaque réponse représente la moyenne de trois répétitions. L'analyse des résultats a révélé que le mélange équiproportionnel des trois HEs ainsi que le mélange ternaire (0,167 : *E. polybractea* /0,167 : *O. mixta* /0,667 : *L. burnatii*) étaient les formulations les plus performantes, présentant la plus forte activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus*. En outre, le mélange binaire entre l'HE d'*E. polybractea* et *O. mixta* et le mélange ternaire (0,667 : *E. polybractea* /0,167 : *O. mixta* /0,167 : *L. burnatii*) ont montré des effets anti-*Candida* importants.

Tableau 25. Diverses combinaisons générées par le plan de mélange sélectionné et les réponses expérimentales obtenues pour chaque souche microbienne testée.

N° d'expérience [a]	*E. polybractea* (EPHE)	*O. mixta* (OMHE)	*L. burnatii* (LBHE)	CMI %(v/v) [b]		
				E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
1	1	0	0	2	0,25	0,5
2	0	1	0	6	0,5	1
3	0	0	1	1	0,25	1
4	0,5	0,5	0	2	0,25	0,125
5	0,5	0	0,5	2	0,25	1
6	0	0,5	0,5	2	0,25	0,25
7	0,333	0,333	0,333	0,5	0,125	0,25
8	0,333	0,333	0,333	0,5	0,125	0,25
9	0,333	0,333	0,333	0,5	0,125	0,25
10	0,667	0,167	0,167	1	0,125	0,125
11	0,167	0,667	0,167	2	0,25	0,25
12	0,167	0,167	0,667	0,5	0,125	0,5

[a] Les expériences ont été réalisées après randomisation. [b] Chaque réponse est la moyenne de trois répétitions.

2. Validation statistique du modèle postulé

Les données de réponse expérimentales ont été soumises à une analyse statistique afin de valider le modèle choisi pour chaque souche microbienne testée, qui représente la corrélation entre les facteurs et les réponses.

2.1 *E. coli*

D'après les données de l'analyse de la variance présentés dans le tableau 26, nous pouvons déduire que l'impact principal de la régression est statistiquement significatif car la probabilité de la signification du risque (*p*-value) est inférieure à 0,05 (<0,0001*).

De plus, le calcul de $F_{Ratio(R/r)}$ (117,69) a donné une valeur supérieure à la valeur théorique de $F_{(0,05\ ;\ 6,5)}$ à un niveau de confiance de 95 %.

Les coefficients de détermination (R^2) et ($R^2_{ajusté}$) obtenues sont respectivement de 99% et 98%.

Tableau 26. Analyse de la variance du modèle ajusté contre *E. coli*.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport *F*	*p*-value
Régression	6	25,486212	4,24770	117,6945	<0,0001*
résidus	5	0,180455	0,03609		
Total	11	25,666667			
R^2	99%				
R^2 ajusté	98%				

* : statistiquement significatif ; R^2 : Coefficient de détermination.

Ces analyses témoignent d'une excellente concordance entre les valeurs expérimentales et celles prédites du modèle ajusté. Ces résultats ont été confirmées par la figure 15, qui montre que la courbe des valeurs réelles en fonction des valeurs prédites ressemble exactement à une ligne droite.

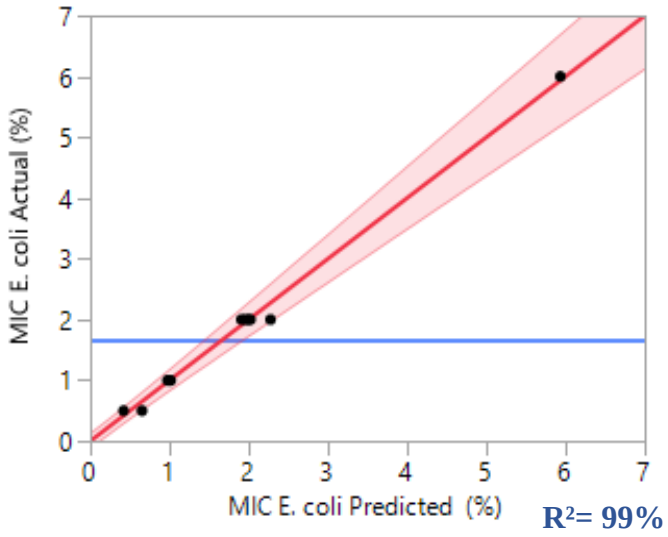


Figure 15. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs prédites pour la souche *E. coli*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées.

2.2 *S. aureus*

Les résultats de l'analyse de la variance exposés dans le tableau 27 révèlent que l'impact principal de la régression est statistiquement significatif, car leur signification de risque (*p*-value) est inférieure à 0,05 (0.001*).

En outre, le calcul de $F_{ratio\ (R/r)}$, qui est égale à 29.41 a indiqué qu'il est supérieur à la valeur théorique de $F_{(0,05\ ;\ 6,5)}$ au niveau de confiance de 95 %.

La significativité d'un modèle augmente avec les valeurs du coefficient de détermination (R^2) et ($R^2_{\ ajusté}$). Ainsi, les coefficients de détermination R^2 étaient de 97**%**, tandis que le $R^2_{\ ajusté}$ est égal à 93**%** (tableau 27). Ces valeurs très satisfaisantes, montrent un excellent accord entre les valeurs observées et celles attendues du modèle mathématique adapté. Ceci est confirmé par la figure 16, qui représente une courbe linéaire des valeurs expérimentales en fonction des valeurs prévues.

Tableau 27. Analyse de la variance du modèle postulé contre *S. aureus*.

Source de variance	**Degrés de liberté**	**Somme des carrés**	**Carré moyen**	**Rapport *F***	***p*-value**
Régression	6	0.125	0.021	29.41	0.001*
résidus	5	0.004	0.0007		
Total	11	0.129			
R^2	97**%**				
R^2 ajusté	93**%**				

* : statistiquement significatif ; R^2 : Coefficient de détermination.

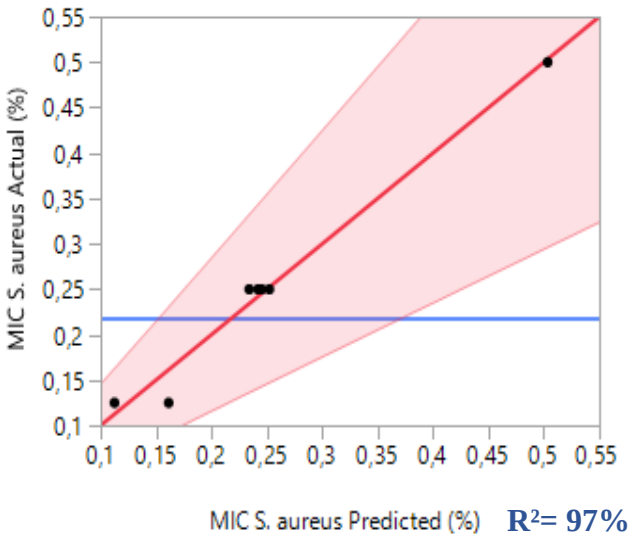


Figure 16. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la souche *S. aureus*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées.

2.3 *C. albicans*

Les données de l'ANOVA montrent que l'impact principal de la régression est statistiquement significatif pour la réponse étudiée, puisque la probabilité de signification du risque (*p*-value=0,0025) est inférieure à 0,05 (Tableau 28). Évidemment, la computation de $F_{ratio\ (R/r)} = 19,72$ a montré qu'il est supérieur à la valeur théorique de $F_{(0,05\ ;\ 6,5)}$ à un niveau de confiance de 95 %

Tableau 28. Analyse de la variance du modèle postulé contre *C. albicans*.

Source de variance	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport *F*	*p*-value
Régression	6	1,2692	0,2115	19,7206	0,0025*
résidus	5	0,0536	0,0107		
Total	11	1,3230			
R^2	96%				
R^2 ajusté	92%				

* : statistiquement significatif ; R^2 : Coefficient de détermination.

Les coefficients de détermination (R^2) et de détermination ajustée ($R^2_{ajusté}$) obtenus sont de 96 % et 92 %, respectivement. Ce qui reflète un excellent accord entre les données expérimentales et celles prévues par le modèle mathématique ajusté. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus dans la figure 17, qui présente une courbe linéaire pour les valeurs réelles en fonction des valeurs prédites.

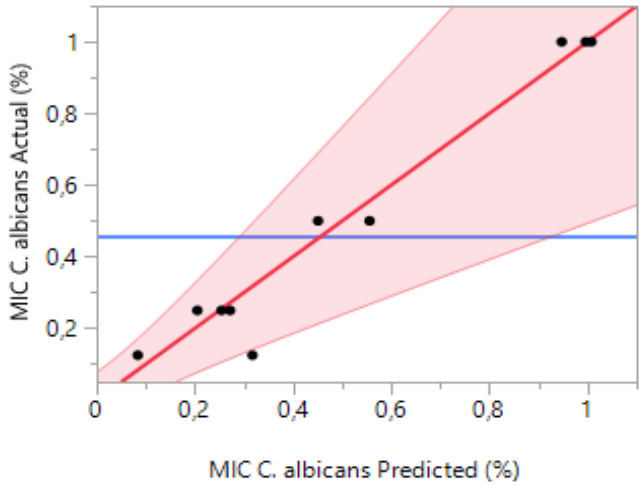


Figure 17. Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la souche *C. albicans*. Les lignes rouges montrent la courbe des valeurs réelles de CMI en fonction de celles attendues. Les lignes horizontales bleues indiquent la moyenne des valeurs observées.

3. Effets des facteurs et modèles ajustés

3.1 *E. coli*

Les impacts de tous les facteurs étudiés, leurs valeurs statistiques *t*-student correspondantes et la probabilité observée (*p*-value) sont résumés dans le tableau 29. Les coefficients du modèle mathématique étaient statistiquement significatifs lorsque leur *p*-value était inférieure à 0,05, tandis que ceux dont la valeur était supérieure à 0,05 ont été exclus du modèle présumé.

Tableau 29. Coefficients de régression estimés pour le modèle adopté contre *E. coli*.

Terme	Coefficients	Estimation	Erreur standard	Rapport *t*	*P*-value
E. polybractea	δ_1	2,015	0,1834	10,99	0,0001*
O. mixta	δ_2	5,924	0,18347	32,29	<0,0001*
L. burnatii	δ_3	0,970	0,1834	5,29	0,0032*
E. polybractea * *O. mixta*	δ_{12}	-8,120	0,9239	-8,79	0,0003*
E. polybractea * *L. burnatii*	δ_{13}	1,970	0,9239	2,13	0,086
O. mixta * *L. burnatii*	δ_{23}	-6,210	0,9239	-6,72	0,0011*
E. polybractea * *O. mixta* * *L. burnatii*	δ_{123}	-32,040	5,0257	-6,38	0,0014*

*Statistiquement significatif à $p < 0,05$.

Les coefficients statistiquement significatifs pour la réponse $CMI_{E.\ coli}$ sont ceux qui illustrent les impacts des HEs purs (δ_1, δ_2 et δ_3), suivis par le coefficient d'interaction binaire entre les HEs d'*E. polybractea* et d'*O. mixta* (δ_{12}), ainsi qu'entre les HEs d'*O. mixta* et de *L. burnatii* (δ_{23}) et enfin un terme ternaire (δ_{123}). Ces résultats montrent que l'action antibactérienne contre cette souche dépend de tous les termes du modèle mathématique modulé, à l'exception du coefficient associé au terme binaire (δ_{13}) entre les HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii*.

Par conséquent, le modèle mathématique adopté, représentant la réponse en termes des facteurs significatifs a été défini par l'équation suivante :

$$Y = 2{,}015\mathrm{E}_{1_1} + 5{,}924\,\mathrm{E}_2 + 0{,}970\mathrm{E}_3 - 8{,}120\mathrm{E}_1\mathrm{E}_2 - 6{,}210\mathrm{E}_2\mathrm{E}_3 - 32{,}040\mathrm{E}_1\mathrm{E}_2\mathrm{E}_3 + \varepsilon \quad (3)$$

3.2 *S. aureus*

Les effets de tous les facteurs examinés, sur *S. aureus*, ainsi que leurs *p*-value (probabilité observée) et les valeurs statistiques de *t*-student sont répertoriés dans le tableau 30.

De manière similaire à la souche *E. coli*, tous les termes du modèle mathématique adapté (δ_1, δ_2, δ_3, δ_{12}, δ_{23} et δ_{123}) sont statistiquement significatifs, à l'exception du coefficient représentant le mélange binaire entre les HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii* (α_{13}).

Ces résultats reflètent que l'effet antibactérien contre *S. aureus* dépend de tous les termes du modèle ajusté, sauf ceux concernant l'interaction binaire entre les HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii*.

Tableau 30. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté contre *S. aureus.*

Terme	Coefficients	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
E. polybractea	δ_1	0,242	0,0257	9,40	0,0002*
O. mixta	δ_2	0,503	0,0257	19,56	<0,0001*
L. burnatii	δ_3	0,242	0,0257	9,40	0,0002*
*E. polybractea * O. mixta*	δ_{12}	-0,510	0,1296	-3,93	0,0111*
*E. polybractea * L. burnatii*	δ_{13}	-0,031	0,1296	-0,25	0,8158
*O. mixta * L. burnatii*	δ_{23}	-0,510	0,1296	-3,93	0,0111*
*E. polybractea * O. mixta * L. burnatii*	δ_{123}	-2,700	0,7050	-3,83	0,0123*

*Statistiquement significatif à $p < 0,05$.

Par conséquent, le modèle mathématique supposé, illustrant la réponse analysée en fonction de trois constituants, est exprimé par l'équation suivante :

$$Y = 0{,}242\,\mathrm{E}_1 + 0{,}503\,\mathrm{E}_2 + 0{,}242\mathrm{E}_3 - 0{,}510\mathrm{E}_1\mathrm{E}_2 - 0{,}510\mathrm{E}_2\mathrm{E}_3 - 2{,}700\mathrm{E}_1\mathrm{E}_2\mathrm{E}_3 + \varepsilon \quad (4)$$

3.3 *C. albicans*

Les effets de toutes les variables indépendantes testés sur *C. albicans*, ainsi que leurs valeurs statistiques de *t*-student et la probabilité observée (*p*-value), sont répertoriés dans le tableau 31.

Tableau 31. Coefficients de régression estimés pour le modèle adopté contre *C. albicans*.

Terme	Coefficients	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
E. polybractea	δ_1	0,451	0,100028	4,51	0,0064*
O. mixta	δ_2	1,007	0,100028	10,07	0,0002*
L. burnatii	δ_3	0,996	0,100028	9,96	0,0002*
*E. polybractea * O. mixta*	δ_{12}	-2,583	0,503695	-5,13	0,0037*
*E. polybractea * L. burnatii*	δ_{13}	0,894	0,503695	1,78	0,1359
*O. mixta * L. burnatii*	δ_{23}	-2,991	0,503695	-5,94	0,0019*
*E. polybractea * O. mixta * L. burnatii*	δ_{123}	-2,520	2,739956	-0,92	0,3999

*Statistiquement significatif à $p < 0,05$.

D'après ce tableau 31, les coefficients statistiquement significatifs incluent les termes linéaires δ_1, δ_2 et δ_3, ainsi que les termes de la formulation binaire entre les HEs d'*E. polybractea* et d'*O. mixta* (δ_{12}), et les HEs d'*O. mixta* et de *L. burnatii* (δ_{23}). Ceci suggère que l'activité antifongique contre *C. albicans* dépend de tous les termes du modèle mathématique ajusté, à l'exception de ceux reflétant l'interaction entre les HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii* (σ_{13}), ainsi que l'interaction entre les trois HEs examinées (σ_{123}). En effet, le modèle mathématique montrant la réponse examinée en fonction des facteurs statistiquement significatifs est désigné par l'équation ci-dessous

$$Y = 0{,}451\mathrm{E}_1 + 1{,}007\mathrm{E}_2 + 0{,}996\mathrm{E}_3 - 2{,}583\mathrm{E}_1\mathrm{E}_2 - 2{,}991\mathrm{E}_2\,\mathrm{E}_3 + \varepsilon \quad (5)$$

4. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

Le processus d'optimisation adoptant l'approche du plan de mélange permet de déterminer la formulation optimale des trois HEs démontrant la meilleure valeur de la CMI, c'est-à-dire la concentration la plus faible présentant la plus grande sensibilité (Falleh et al., 2019). Puisque les modèles statistiquement validés sont également prédictifs, ces résultats optimaux ne correspondent pas forcément à ceux enregistrés lors des 12 essais effectués ; néanmoins, il est possible de les prédire avec précision dans le domaine expérimental étudié.

Afin d'obtenir un aperçu sur les valeurs optimales de la CMI pouvant être atteintes, le point de départ était les meilleures valeurs obtenues lors de la réalisation des tests.

En tant que tel, les meilleures valeurs de CMI enregistrées étaient de 0,5 % ; 0,125% et 0,125% pour *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*, respectivement. En conséquence, une formulation des trois HEs permettant d'obtenir des réponses inférieures ou égales à ces valeurs, sera acceptée.

Dans cette étude, il est important de souligner que les effets antimicrobiens des formulations optimales contre les trois souches testées étaient plus élevés que ceux des HEs pures. Cette interaction positive est illustrée dans les figures 18, 20 et 22, où la zone de mélange optimale est située au centre du triangle. Le tracé des contours et les surfaces 3D (tracés de mélange 2D et 3D, respectivement) ont montré des interactions entre chaque variable indépendante utilisée dans le mélange. Ce graphique illustre les changements de réponse, la zone bleue plus foncée représentant des valeurs de CMI plus faibles et un potentiel antimicrobien plus élevé, tandis que la couleur verte à rouge indique des valeurs de CMI moyennes à élevées.

Par conséquent, l'approche de la conception de mélanges a permis d'optimiser les proportions de chaque composé actif dans un mélange, afin de développer une formulation optimale, caractérisé par une forte activité antimicrobienne.

4.1 Efficacité de la formulation des HEs contre *E. coli.*

Les valeurs de la CMI $_{E.\ coli}$ obtenues à partir de diverses expériences varient de 0,5 à 6 % (tableau 25). Les tracés de contour et de surface de cette réponse (figure 18) nous permettent d'explorer les différentes activités relatives aux diverses proportions des trois HEs étudiées.

Une CMI de 0,40 % a été déterminée comme le compromis optimal contre *E. coli*. D'après les graphiques de mélange 2D et 3D, nous pouvons conclure qu'un mélange des HEs d'*E. polybractea* (EPHE) et d'*O. mixta* (OMHE) et de *L. burnatii* (LBHE), est nécessaire pour atteindre cette valeur de CMI.

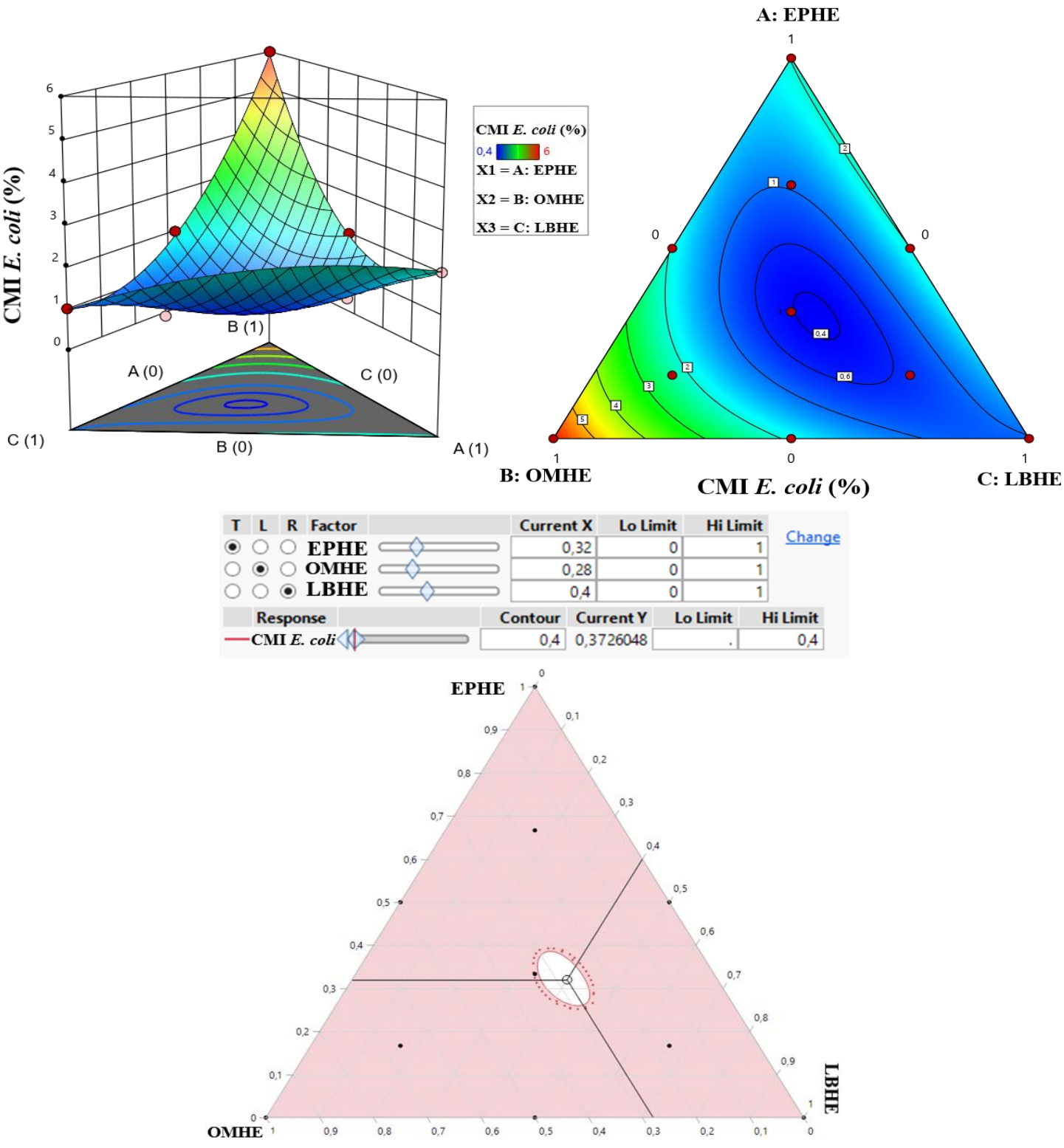


Figure 18. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *E. coli.*

Afin de connaître précisément les proportions optimales des trois HEs conduisant à la réponse souhaitée, la fonction de désirabilité a été utilisé, donnant un réglage optimal des proportions avec un niveau de compromis.

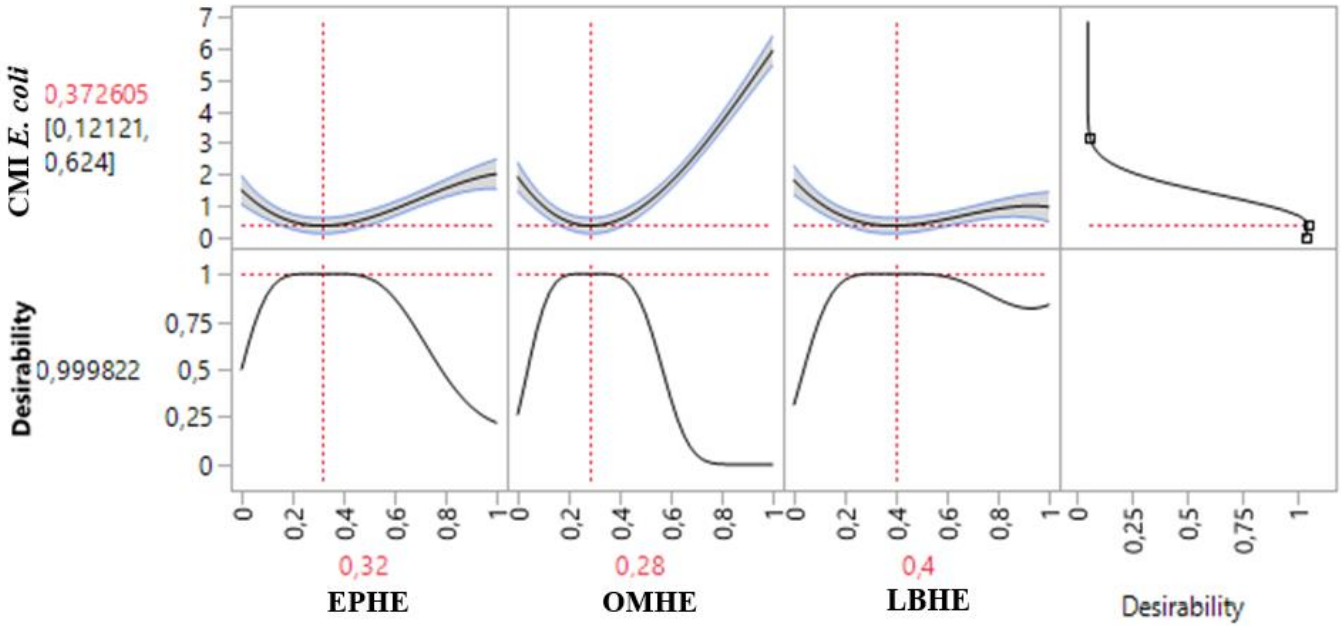


Figure 19. Profil de désirabilité révélant les proportions précises des HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et de *L. burnatii* (LBHE), conduisant à une activité antibactérienne optimale contre la souche *E. coli*.

D'après la figure 19, la meilleure valeur de CMI atteignable est de 0,372%, avec une désirabilité d'environ 99%, en assurant un mélange aux proportions suivantes :

- Une proportion de l'HE d'*E. polybractea* (EPHE) égale à 32% ;
- Une proportion de l'HE d'*O. mixta* (OMHE) égale à 28 %.
- Une proportion de l'HE de *L. burnatii* (LBHE) égale à 40 %.

4.2 Efficacité de la formulation des HEs contre *S. aureus.*

Les résultats de l'essai de micro-dilution ont révélé une variation de la réponse de la $CMI_{S.\ aureus}$ comprise entre 0,125 et 0,5 %. En outre, les illustrations du diagramme de mélange 3D et 2D (figure 20) ont montré que la zone de compromis optimale (zone bleu foncé) correspondant à la CMI souhaitée d'environ 0,12%, nécessite un mélange constitué essentiellement des HE d'*E. polybractea, O. mixta* et de *L. burnatii*.

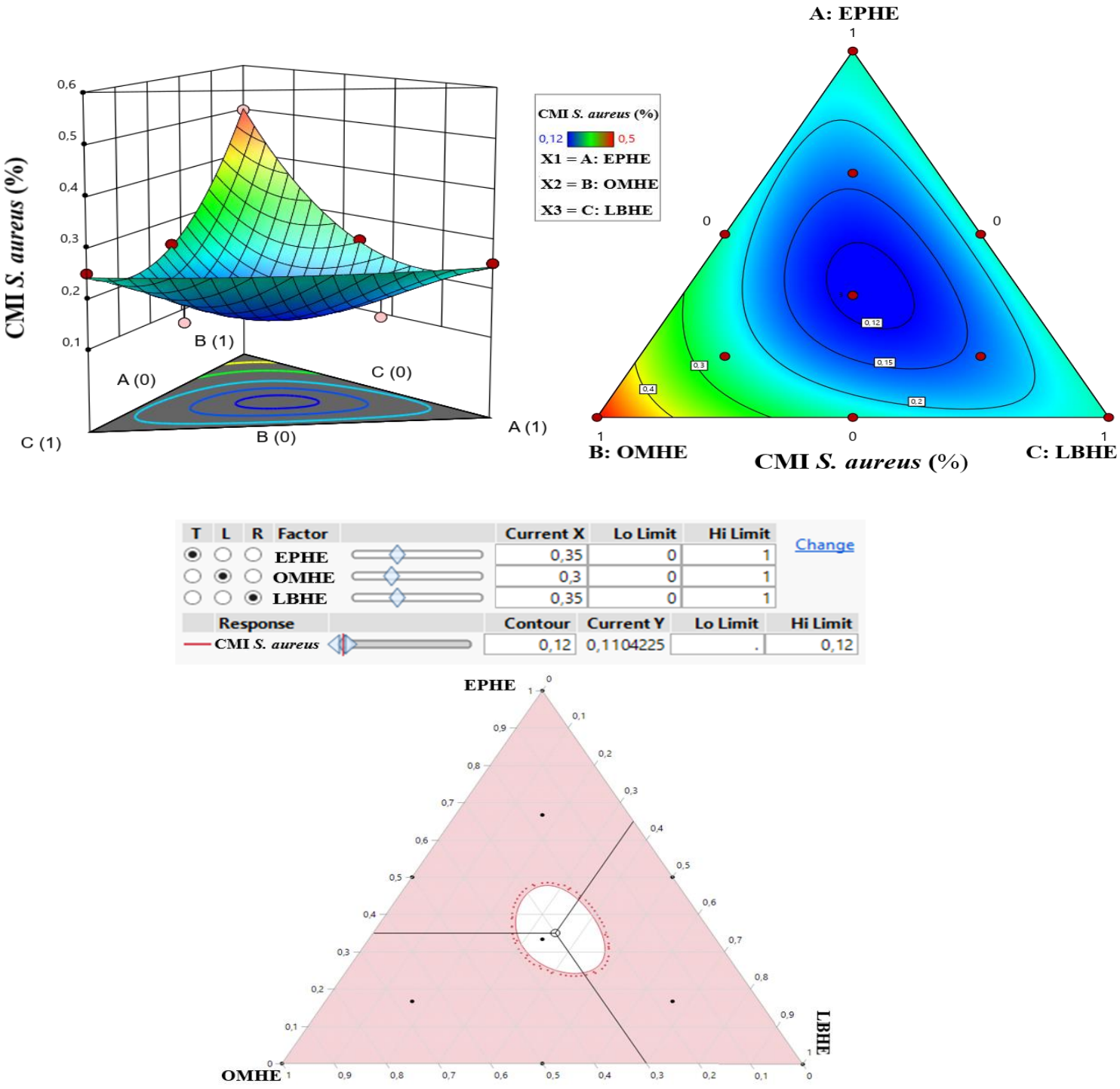


Figure 20. Profil de mélange 2D et 3D, illustrant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *S. aureus*.

Ces résultats ont été confirmés par la fonction de désirabilité (figure 21), qui a démontré que la meilleure valeur de CMI atteignable est égale à 0,110% avec une désirabilité de 99,98%. Ceci a été obtenu en réalisant un mélange ternaire optimal composé d'environ 35 % de l'HE d'*E. polybractea*, 30 % d'*O. mixta* et 35 % de *L. burnatii*.

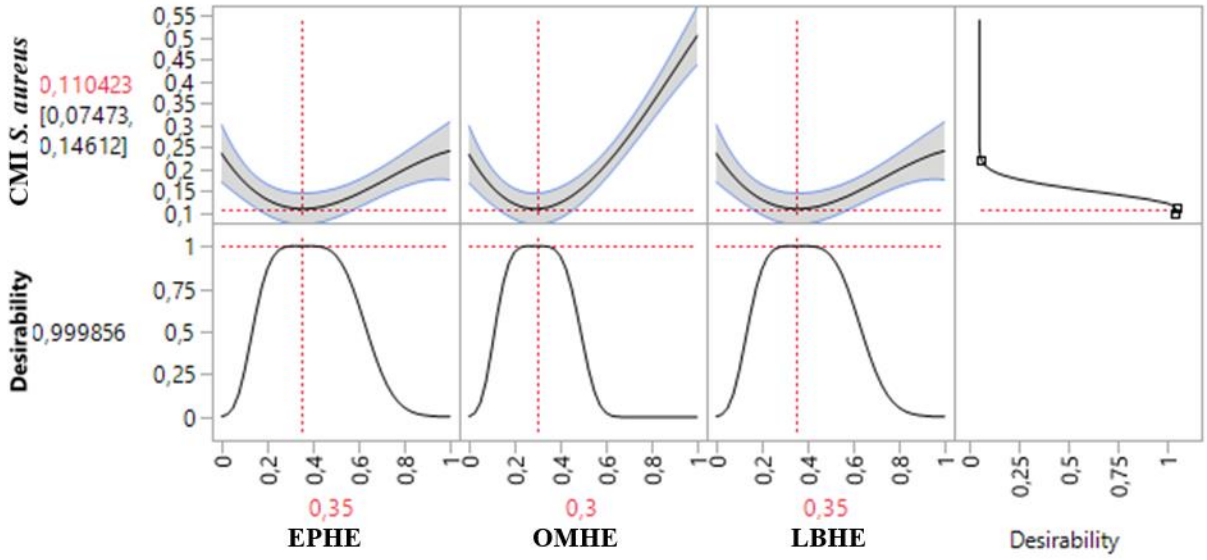


Figure 21. Profil de désirabilité montrant les proportions optimisées des trois HEs étudiées conduisant à une activité antibactérienne optimale contre la souche *S. aureus*.

4.3 Efficacité de la formulation des HEs contre *C. albicans.*

Les valeurs enregistrées pour la réponse CMI $_{C.\ albicans}$ variaient entre 0,125 et 1 % (Tableau 25). L'illustration affichée dans les tracés de contour et de surface (Figure 22), indique que la zone de compromis optimale (zone bleu foncé), correspondant à la CMI souhaitée de 0,125%, nécessite l'utilisation d'un mélange binaire composé des HEs d'*E. polybractea*, et d'*O. mixta*. Par conséquent, l'HE de *L. burnatii* doit être fixée dans sa faible proportion (0%).

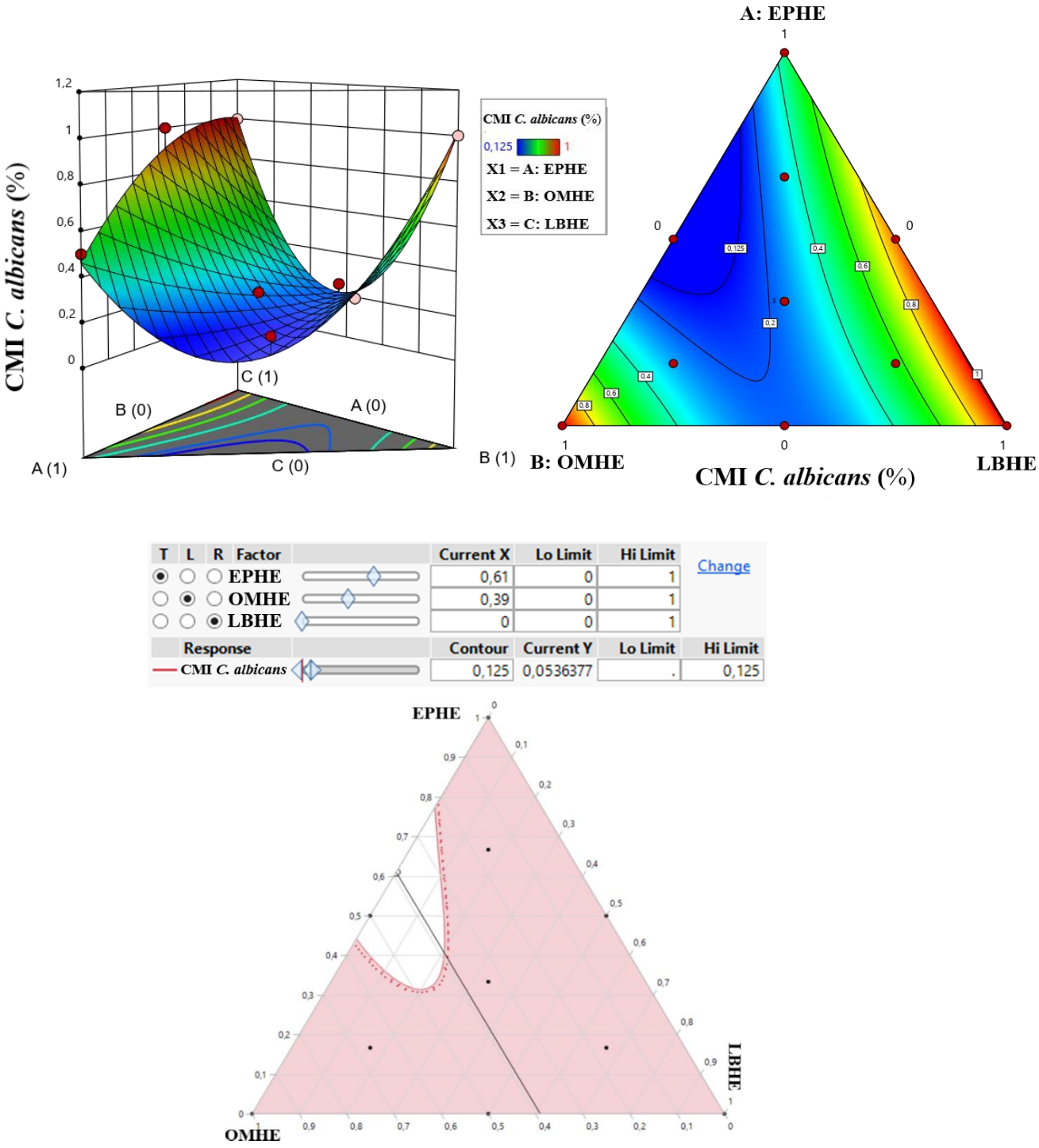


Figure 22. Profil de mélange 2D et 3D, affichant la zone de compromis optimale conduisant à la valeur de CMI souhaitée (%) contre la souche *C. albicans*.

La fonction de désirabilité confirme les résultats obtenus précédemment et suggère qu'il y a une possibilité de 99% d'atteindre la meilleure valeur de CMI (0,053%) en garantissant un mélange binaire optimal comprenant 61 % d'HE d'*E. polybractea,* et 39% d'*O. mixta* (figure 23).

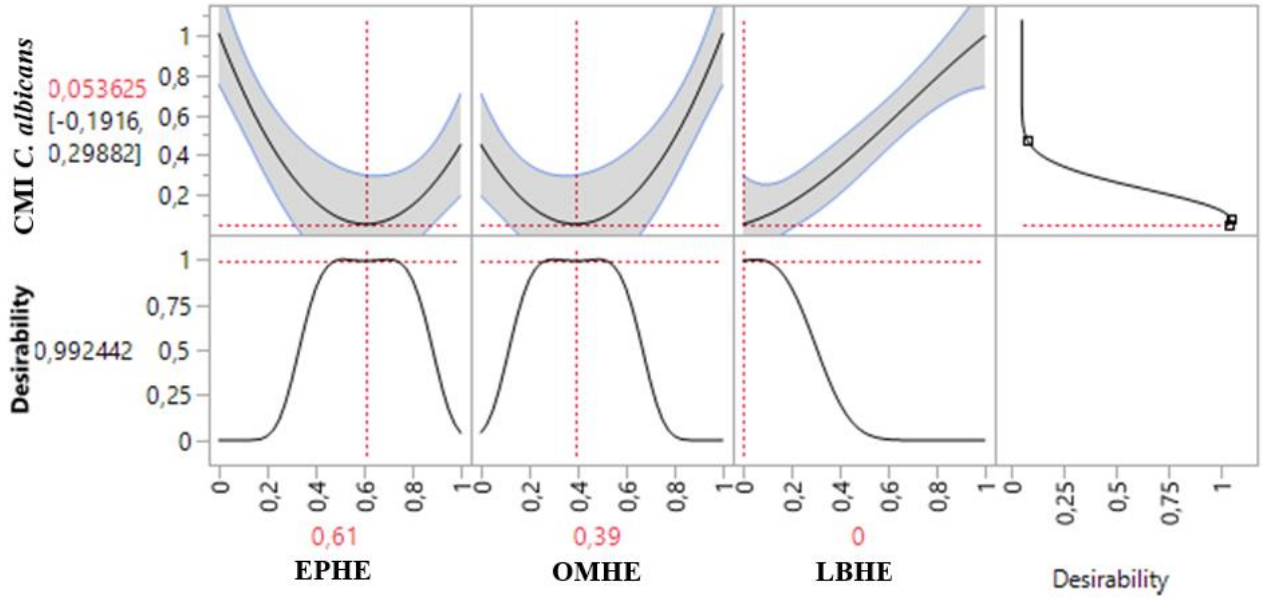


Figure 23. Graphique de désirabilité montrant les proportions précises des trois HEs étudiées conduisant à la meilleure action antifongique vis-à-vis *C. albicans*.

De nombreux chercheurs utilisent actuellement la méthodologie de conception de mélanges pour évaluer les interactions potentielles entre les différents constituants du mélange, en vue d'estimer la formulation optimale (Chraibi et al., 2021; Falleh et al., 2019; Kachkoul et al., 2021; Ouedrhiri et al., 2016; Souiy et *al.*, 2021).

Ouedrhiri et ses coauteurs ont adopté la méthodologie du plan de mélange pour étudier les interactions potentielles entre les HEs de *Thymus serpyllum* L., *Origanum majorana* L., et *Origanum compactum* Benth., vis-à-vis de *E. coli*, de *S. aureus* et de *Bacillus subtilis* (Ouedrhiri et al., 2016). Les résultats obtenus ont révélé que le mélange optimal prédit contre *B. subtilis* et *S. aureus* correspondait respectivement à 28 %, 30 % et 42 % d'*O. compactum*, *O. majorana* et *T. serpyllum*. Alors que le mélange optimal prédit contre *E. coli* était composé de 75% de l'HE d'*O. compactum* et 25% de l'HE d'*O. majorana*.

Dans le même contexte, les effets combinés des HEs d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Mentha pulegium* L., *Rosmarinus officinalis* L. contre les bactéries responsables d'infections nosocomiales ont également été optimisés en appliquant le plan simplex-centroïde (Kachkoul et *al.*, 2021). En outre, Chraibi et *al*., (2021) ont utilisé cette méthodologie pour atteindre l'effet antimicrobien optimal des HEs de *Mentha pulegium* L., *Mentha piperita* L., *Ormenis mixta* (L.), contre *Candida tropicalis*, *E. coli* et *S. aureus*. De plus, Falleh et *al.,* (2019) ont optimisé les proportions des HEs de lavande, de cannelle, de clou de girofle, et de myrte en appliquant l'approche de la conception de mélange. La combinaison optimale correspondait à 59,4 % de cannelle, 38,2 % de lavande et 2,4 % de clou de girofle, et a montré un effet synergique contre la souche *E. coli*.

5. Confirmation de l'activité antibactérienne des mélanges obtenus

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des combinaisons optimales obtenues grâce au test de désirabilité a été réalisée en utilisant la méthode de microdilution. Ce test vise à comparer les valeurs prédites avec celles obtenues expérimentalement. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 32.

Tableau 32. Valeurs prédites et expérimentales de la CMI pour le point de test réalisé par les mélanges optimaux trouvés.

	CMI %(v/v)								
	E. coli			***S. aureus***			***C. albicans***		
Composés des mélanges	**Proportions des HEs (%)**	**Valeurs prédites [a]**	**Valeurs expérimentales [b]**	**Proportions des HEs (%)**	**Valeurs prédites [a]**	**Valeurs expérimentales [b]**	**Proportions des HEs (%)**	**Valeurs prédites [a]**	**Valeurs Expérimentales[b]**
E. polybractea	32			35			61		
O. *mixta*	28	0,372±	0,250±	30	0,110±	0,125±0,03	39	0,053±	0,062±
L. burnatii	40	0,01	0,002	35	0,001		0	0,001	0,007

[a]La valeur prédite est donnée avec l'écart-type de la réponse déterminée à partir du modèle.
[b]La valeur expérimentale est la moyenne de trois répétitions avec une erreur standard.

Les résultats expérimentaux révèlent que le mélange ternaire composé de 32% de l'HE d'*E. polybractea*, 28% *O. mixta* et 40% *L. burnatii* a démontré une activité antibactérienne significative contre *E. coli* avec une CMI de 0,250 %. En outre, le mélange de 35% de l'HE d'*E. polybractea*, 30% *O. mixta* et 35% *L. burnatii* possède une activité antibactérienne prometteuse contre *S. aureus* avec une CMI de 0,125%.

Tandis qu'un mélange binaire de 61% d'HE d'*E. polybractea* / 39% *O. mixta* a présenté un effet antifongique puissant contre *C. albicans* avec une CMI de 0,062%. Ces résultats confirment les réponses prédites obtenues grâce au test de désirabilité, qui a montré que le mélange composé de 32% *E. polybractea*, 28% *O. mixta* et 40% *L. burnatii* pouvait inhiber *E. coli* avec une CMI de 0, 372%, alors que le mélange 35% *E. polybractea*, 30% *O. mixta* et 35% *L. burnatii* est efficace contre *S. aureus* avec une CMI de 0,110%. En revanche, un mélange binaire de 61% *E. polybractea* et 39% *O. mixta* a montré un effet inhibiteur contre *C. albicans*, avec une CMI de 0,053 %.

6. Effet synergique entre les HEs

Les résultats de l'optimisation simultanée sont représentés dans le tracé de contour de toutes les réponses générées par les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* (figure 20). Dans cette étude, il est important de souligner que l'effet antimicrobien des formulations optimales était plus élevé que celui des HEs individuelles. Ces données attirent l'attention sur la performance des formulations développées.

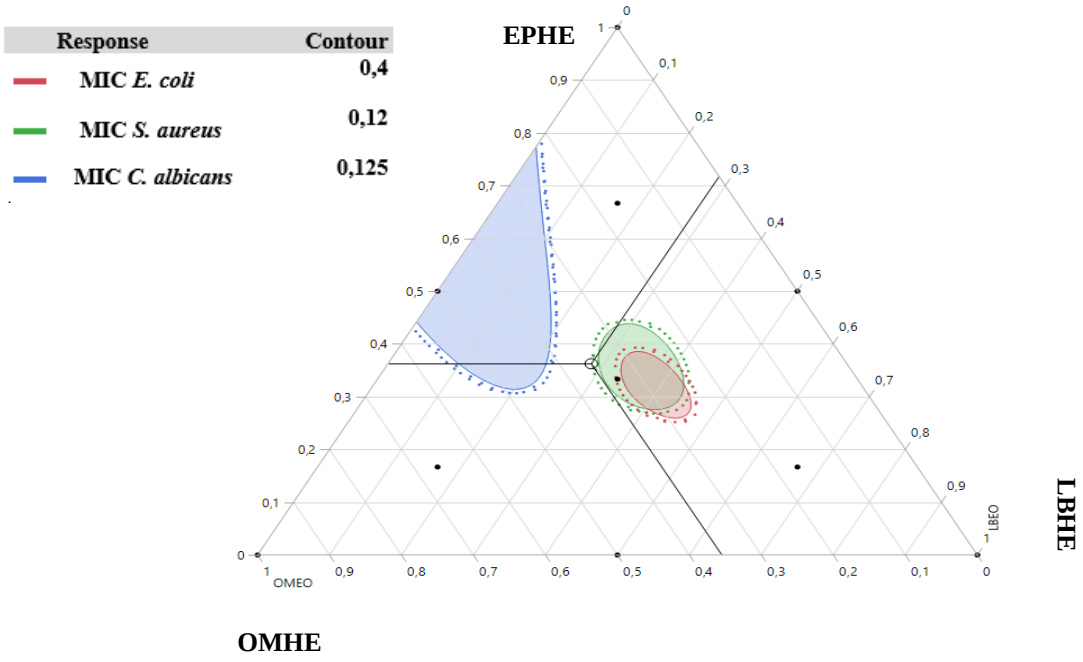


Figure 24. Profil de mélange montrant la zone de combinaison optimale entre les HEs d'*O. mixta* (OMHE), d'*E. polybractea* (EPHE) et de *L. briquit* (LBHE) contre toutes les souches microbiennes testées.

En effet, la zone de compromis souhaitée entre les proportions des trois HEs étudiées afin d'atteindre la CMI désirée nécessite une combinaison ternaire composée des HEs d'*E. polybractea,* d'*O. mixta* et de *L. burnatii* pour les souches *E. coli* et *S. aureus*, tandis qu'un mélange binaire des HEs d'*E. polybractea*, et d'*O. mixta* est suffisant pour atteindre la CMI désirée pour *C. albicans*. La combinaison des trois HEs étudiées, contenues dans les formulations optimales développées, rassemble principalement des monoterpènes oxygénés tels que le 1,8-cinéole, p-Menthane-1,8-diol, le linalol, le camphre et le bornéol, ainsi que des monoterpènes hydrocarbures, notamment le p-cymène, l'α-pinène, le γ-terpinène, le sabinène et le D-limonène. Ces composés volatiles ont différents modes d'action contre les souches microbiennes (Falleh et al., 2019; Hyldgaard et al., 2012).

Les terpénoïdes oxygénés, tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes, sont les principaux composants antimicrobiens des HEs par rapport aux hydrocarbures terpéniques, qui manquent de groupes hydroxyle (-OH) dans leur structure chimique (Al-Mijalli et al., 2023b; Mahmud et al., 2023). En outre, l'effet additif ou synergique contre les souches microbiennes peut être attribué à l'interaction entre les composants mineurs et/ou majeurs des HEs (Burt, 2004; da Silva et al., 2021). Par exemple, certains monoterpènes hydrocarbonés tels que le p-cymène, l'α-pinène et le γ-terpinène, ainsi que le sabinène sont inefficaces en tant qu'agents antimicrobiens lorsqu'ils agissent seuls (Bassolé and Juliani, 2012; De Azeredo et al., 2011; Goetz and Ghedira, 2012; Ultee et al., 2000), mais leur combinaison avec des terpénoïdes oxygénés tels que le linalol, le bornéol, le 1,8-cinéole et/ou carvacrol a montré des activités antimicrobiennes prometteuses.

De même, l'effet synergique entre les HEs testées pourrait s'expliquer par l'interaction entre leurs composants, en particulier entre le 1,8 cinéol et le limonène (Vuuren and Viljoen, 2007), et entre l'α-pinène et le linalol (Tserennadmid et al., 2011), ainsi qu'entre le 1,8 cinéole et le p-cymène (Pina-Vaz et al., 2004). Il est également noté que le β-pinène entraîne une augmentation de la pénétration du terpinène-4-ol à travers la paroi cellulaire (Ouedrhiri et al., 2017). Précisément, les groupes hydroxyle et carbonyle du 1,8-cinéole, et du linalol, représentant les composés majeurs des HEs d'*E. polybractea* et de *L. burnatii*, pourraient désintégrer la membrane externe des cellules microbiennes, facilitant ainsi la pénétration du p-cymène et de l'α-pinène contenus dans les HEs d'*E. polybractea* et d'*O. mixta* dans le cytoplasme et sa combinaison avec les protéines, et induisant par conséquent la mort des cellules microbiennes (Bassolé and Juliani, 2012; Pei et al., 2009).

Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté des activités antimicrobiennes synergiques des HEs extraites de différentes plantes, ainsi qu'entre leurs composants individuels (Bassolé et al., 2010; Chraibi et al., 2021; Fadil et al., 2018; Falleh et al., 2019; Kachkoul et al., 2021; Pei et al., 2009; Ultee et al., 2000; Vuuren and Viljoen, 2007). Fadil et al. (2018) ont rapporté l'activité synergique des HEs de *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L., et *Myrtus communis* L. contre la souche *Salmonella typhimurium*. De même, Kachkoul et al. (2021) ont révélé l'activité synergique des HEs de *Rosmarinus officinalis* L., d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. et de *Mentha pulegium* L. contre trois souches bactériennes, à savoir *S. aureus*, *Proteus mirabilis*, et *Klebsiella pneumoniae*. En outre, Chraibi et al., 2021 ont également examiné les interactions potentielles entre les HEs d'*O. mixta* (L.) Dumort., *Mentha pulegium* L. et *Mentha piperita* L., vis-à-vis de *Candida tropicalis*, *E. coli* et *S. aureus*. La combinaison des HEs de *Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum, Myrtus communis*, and *Lavandula stoechas* a démontré un effet synergique contre *E. coli* (Falleh et al., 2019). Les molécules bioactives des HEs peuvent également provoquer des interactions synergiques. Ultee et al. (2000) ont signalé qu'une combinaison de *p*-cymène et des monoterpènes phénoliques, tels que le carvacrol, a un effet synergique contre les bactéries à Gram positifs. Il convient de mentionner que le *p*-cymène perturbe les membranes cellulaires bactériennes, favorisant ainsi une entrée plus facile du carvacrol dans le cytoplasme (Hyldgaard et al., 2012; Ultee et al., 2000). De même, Vuuren and Viljoen (2007) ont confirmé les effets synergiques de la combinaison 1,8-cinéole/limonène contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Par ailleurs, Bassolé et al. (2010) ont montré que la combinaison de l'eugénol, avec le linalol ou le menthol, possède des effets antimicrobiens synergiques importants, suggérant qu'une combinaison de phénol monoterpénoïde et d'alcool monoterpénoïde est efficace. De plus, les combinaisons de 1,8-cinéole/limonène, 1,8-cinéole/thymol, 1,8-cinéole/p-cymène, α-pinène/linalol, α-pinene / Limonene, Carvacrol/linalool, et Carvacrol/p-cymène ont déjà montré une activité antimicrobienne synergique ou additive (Bassolé et al., 2010; Bassolé and Juliani, 2012; De Azeredo et al., 2011; Pina-Vaz et al., 2004; Tserennadmid et al., 2011; Vuuren and Viljoen, 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a montré de synergie entre le 1,8-cinéole, le p-menthane-1,8-diol et du linalol. De plus, cette combinaison pourrait augmenter le ratio de composés ayant des propriétés antimicrobiennes, tels que le D-limonène, le γ- cadinène et l'α-pinène.

Pris ensemble, ces résultats fournissent des preuves scientifiques sur les applications potentielles des trois HEs étudiées en combinaison afin de développer de nouveaux agents antimicrobiens efficaces, qui peuvent être utiles dans l'emballage alimentaire, la conservation des aliments, ainsi que dans l'élaboration de produits cosmétiques ou biopharmaceutiques. Cependant, des études supplémentaires sur l'action antibactérienne de ces huiles, seules et/ou en combinaison, sont fortement nécessaires afin de décrire clairement comment elles peuvent interagir avec chaque microorganisme. En outre, la littérature a montré que les trois HEs inhibent efficacement la croissance des agents pathogènes d'origine alimentaire (*in vitro*), alors que leur action dans un modèle de système alimentaire (*in vivo*) n'a pas été rapportée. En effet, d'autres études sont nécessaires dans ce domaine pour confirmer les applications potentielles des trois HEs étudiées en tant qu'additifs naturels dans les aliments afin de préserver leur sécurité microbiologique.

IV. Activité antibiofilm / antiadhésive

1. Effet des HEs et leurs mélanges optimaux sur les propriétés physicochimiques de la résine

Les propriétés physicochimiques des surfaces de la résine acrylique, traitées ou non, ont été évaluées à l'aide de la méthode de la goutte sessile (Achinas et al., 2019; Hori and Matsumoto, 2010). En se basant sur les approches de Van Oss et al. (1995), l'hydrophobie a été analysée de manière qualitative et quantitative.

Les données du tableau 33 présentent les angles de contact et les paramètres d'énergie de surface du matériau étudié avant et après l'application des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. briquet*, ainsi que de leurs mélanges optimaux 1 (32 % *E. polybractea* /28% *O. mixta* / 40% *L. briquet*) et 2 (35% *E. polybractea* /30% *O. mixta* / 35% *L. briquet*) contre les souches *E. coli* et *S. aureus*, respectivement. Avant le traitement, la surface de la résine acrylique présentait une hydrophobie qualitative ($\theta w > 65°$) et quantitative ($\Delta Giwi < 0$).

Après le traitement, les valeurs des angles de contact avec l'eau ont diminué pour atteindre des valeurs allant de 5,1 à 32,8. De plus, les valeurs ΔGiwi de la surface traitée avec les HEs seules et leurs mélange optimaux 1 (MO1) et 2 (MO2) ont été améliorées et deviennent positive (8,18 $mJ/m^2 < \Delta Giwi < 39,36\ mJ/m^2$).

Cette variation met en évidence un changement significatif dans l'hydrophobicité des surfaces de la résine acrylique, les rendant qualitativement et quantitativement hydrophiles suite au traitement avec les HEs seules et leurs mélanges optimaux (MO1 et MO2). De plus, les données suggèrent une légère réduction du composant accepteur d'électrons de la surface du matériau traité (0,02 $mJ/m^2 < \gamma + < 1,82\ mJ/m^2$). En revanche, le paramètre donneur d'électrons a connu une augmentation significative lors du traitement avec les trois HEs étudiées et leurs formulations optimale (36,28 $mJ/m^2 < \gamma - < 59,10\ mJ/m^2$).

Il a été observé que les surfaces de la résine acrylique non traités et traités présentent un caractère acido-basique (γAB) avec des valeurs allant de 35,3 à 50,8 mJ/m^2. De plus, le matériau étudié a montré des valeurs de Lifshitz Van Der Waals important ($35,18 \pm mJ/m^2 < \gamma LW < 55,0 \pm mJ/m^2$). Selon nos résultats, les traitements avec les HEs et leurs MO1 et MO2 ont considérablement entravé l'adhésion des deux souches bactériennes pendant les 10 heures d'incubation. Cette inhibition de l'adhérence bactérienne peut être attribuée à la modification des propriétés physico-chimiques de la surface de de la résine acrylique induite par les HEs. En effet, cette altération peut être expliquée par l'existence de composés bioactifs qui peuvent adhérer à la surface du matériau et former un film hydrophile qui diminue l'adhésion bactérienne (Hori and Matsumoto, 2010; Lekbach et al., 2018).

Tableau 33. Valeurs d'angle de contact (θ), des paramètres de tension superficielle (γ+ et γ−), des composants apolaires (γLW) et polaires (γAB), de l'hydrophobicité (ΔGiwi) de la surface de résine non traitée et traitée.

Substrat/ Souche	**Angles de contact (°)**			**Énergie de surface : composants et paramètres(mJ/m²)**					
	θ_W	θ_F	θ_D	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}	γ^{Tol}	ΔG_{iwi}
Résine non traitée	78,7	46,3	48,2	35,18	2,35	2,689	35,3	40,1	-51,17
Résine traitée par OMHE	5,1	15,7	0,0	50,69	0,02	59,10	50,8	52,8	39,36
Résine traitée par EPHE	32,8	36,4	10,6	41,25	1,82	36,28	41,4	57,2	8,18
Résine traitée par LBHE	12,8		15,8	55,0	0,1	51,3	48,9	54,2	12,41
Résine traitée par Mélange 1 (*E. coli*)	12,3	5,0	11,2	49,73	0,10	57,71	49,8	54,2	36,67
Résine traitée par Mélange 2 (*S. aureus*)	15,0	9,8	45,0	36,93	1,61	55,85	37,0	55,4	32,63

Valeurs d'angle de contact (θ), des paramètres de tension superficielle (γ+ et γ−), des composants apolaires (γLW) et polaires (γAB), de l'hydrophobicité (ΔGiwi) de la surface de résine non traitée et traitée. Lifshitz – Van Der Waals ΔGLW (mJ/m^2), acide-base ΔGAB (mJ/m^2) et énergie libre totale d'interaction ΔGTotal (mJ/m^2) pour l'adhésion de S. aureus sur matériau non traité et traité.

2. Evaluation de l'adhésion bactérienne à la surface de résine acrylique

Les figures 25 et 26 présentent les résultats respectifs de l'adhésion *de S. aureus* et *E. coli* à la surface de la résine acrylique. L'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) a montré que les deux souches bactériennes étudiées avaient des affinités différentes pour ce matériau.

En effet, *S. aureus* a adhéré à la surface de la résine acrylique dans une plus grande mesure que *E. coli*, avec des pourcentages d'adhésion respectifs de 89,02 ± 1,13% et 78,81 ± 2,71 % (tableau 34).

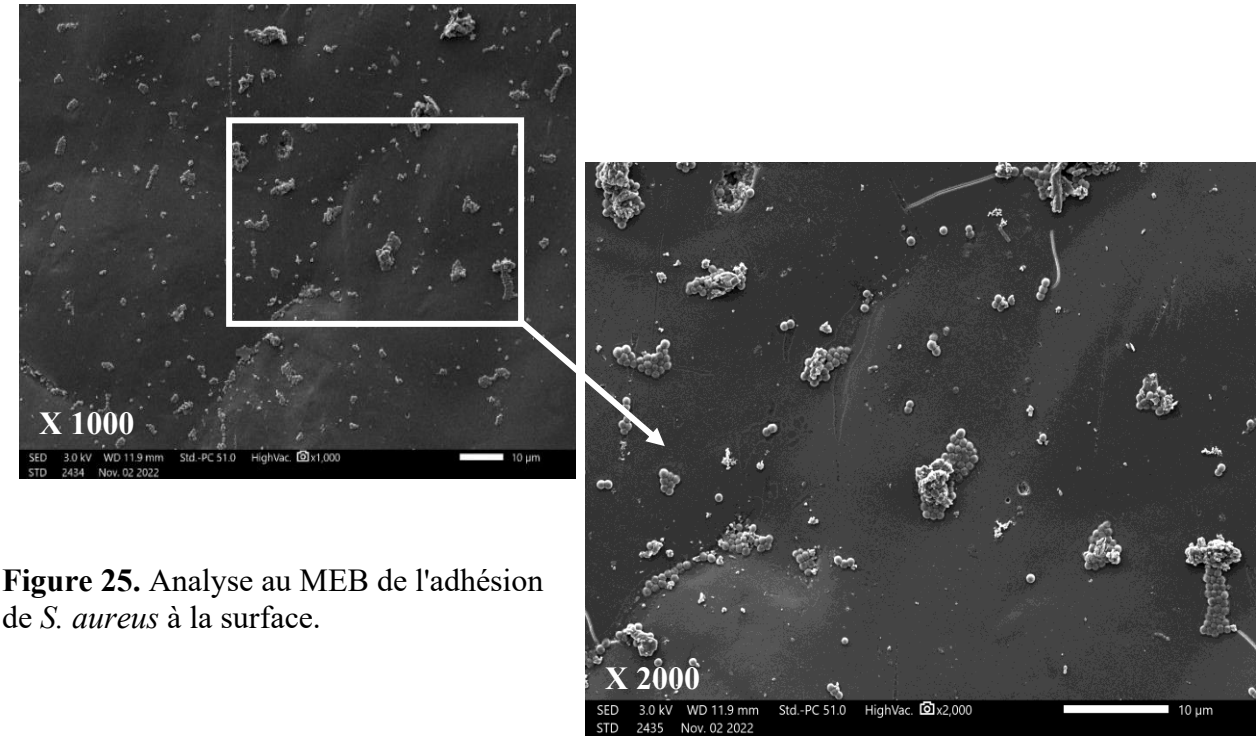


Figure 25. Analyse au MEB de l'adhésion de *S. aureus* à la surface.

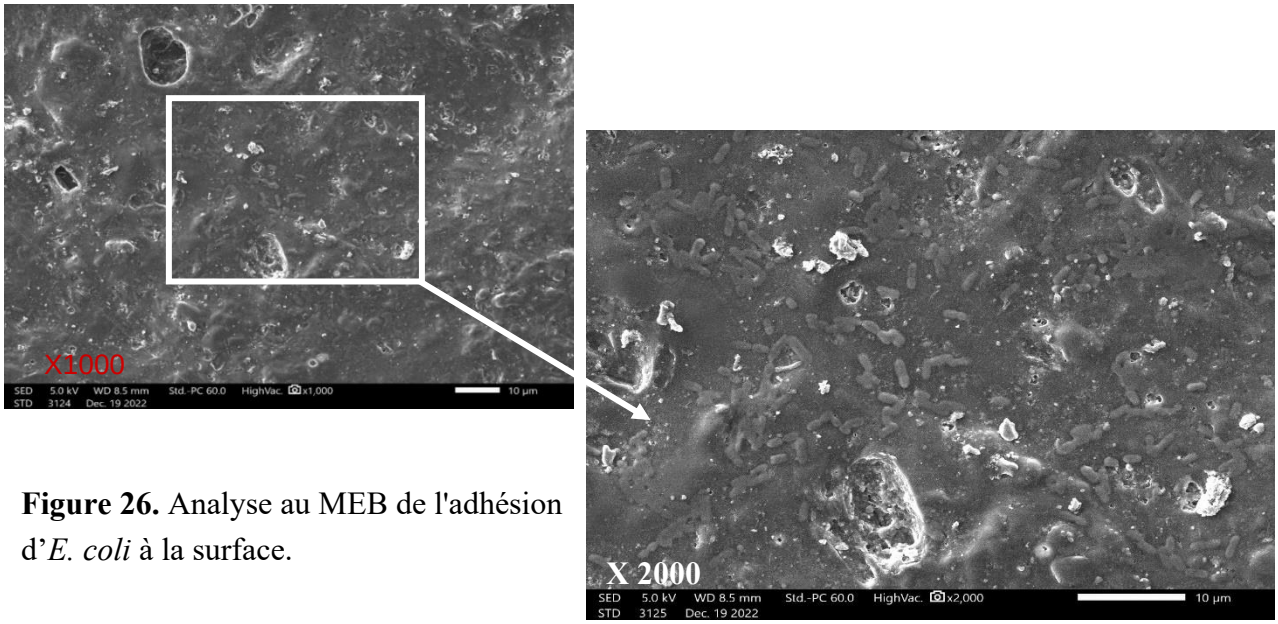


Figure 26. Analyse au MEB de l'adhésion d'*E. coli* à la surface.

En outre, une différence significative a été observée entre les surfaces des coupons de contrôle et celles traitées avec des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et de *L. briquet* et leurs mélanges optimaux (figures 27 et 28).

Pour *E. coli*, l'attachement bactérien sur le coupon non traité dépassait 70 %, tandis que sur les coupons traités avec les HEs de *L. briquet*, *O. mixta* et de *E. polybractea*, l'attachement des cellules variait de 14,23 ± 0,58 à 33,12 ± 0,71%. De plus, l'application du mélange optimal 1 (32 % *E. polybractea* /28% *O. mixta* / 40% *L. briquet*) sur la surface de la résine acrylique a significativement amélioré ses propriétés anti-adhésion, avec un pourcentage d'adhésion réduit à 11,67 ± 0,43% (tableau 34).

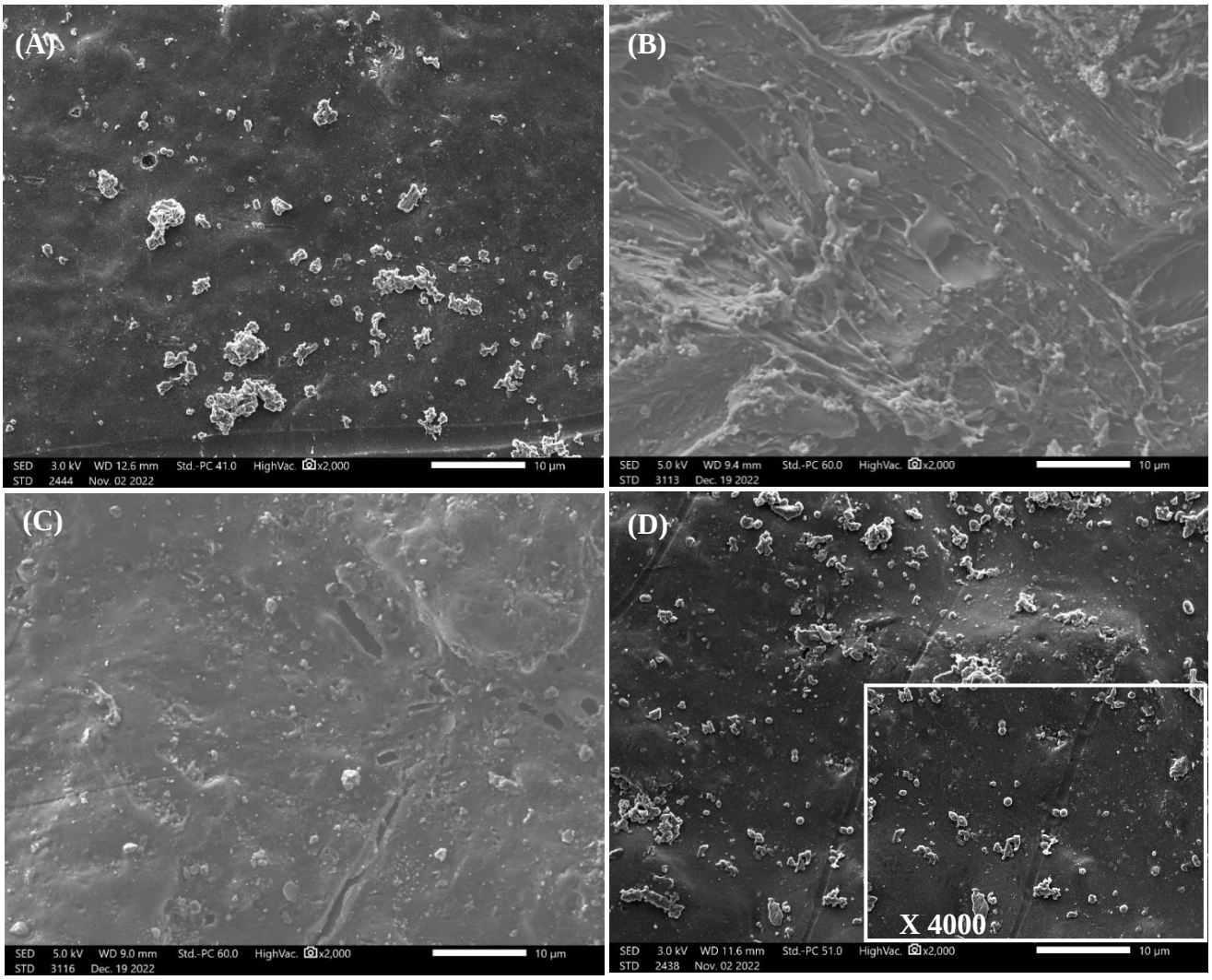


Figure 27. Analyse MEB (×2000) de l'adhésion de *S. aureus* avec (A) l'HE de *E. polybractea*, (B) l'HE d'*O. mixta*, (C) l'HE de *L.briquet* et (D) Mélange 2.

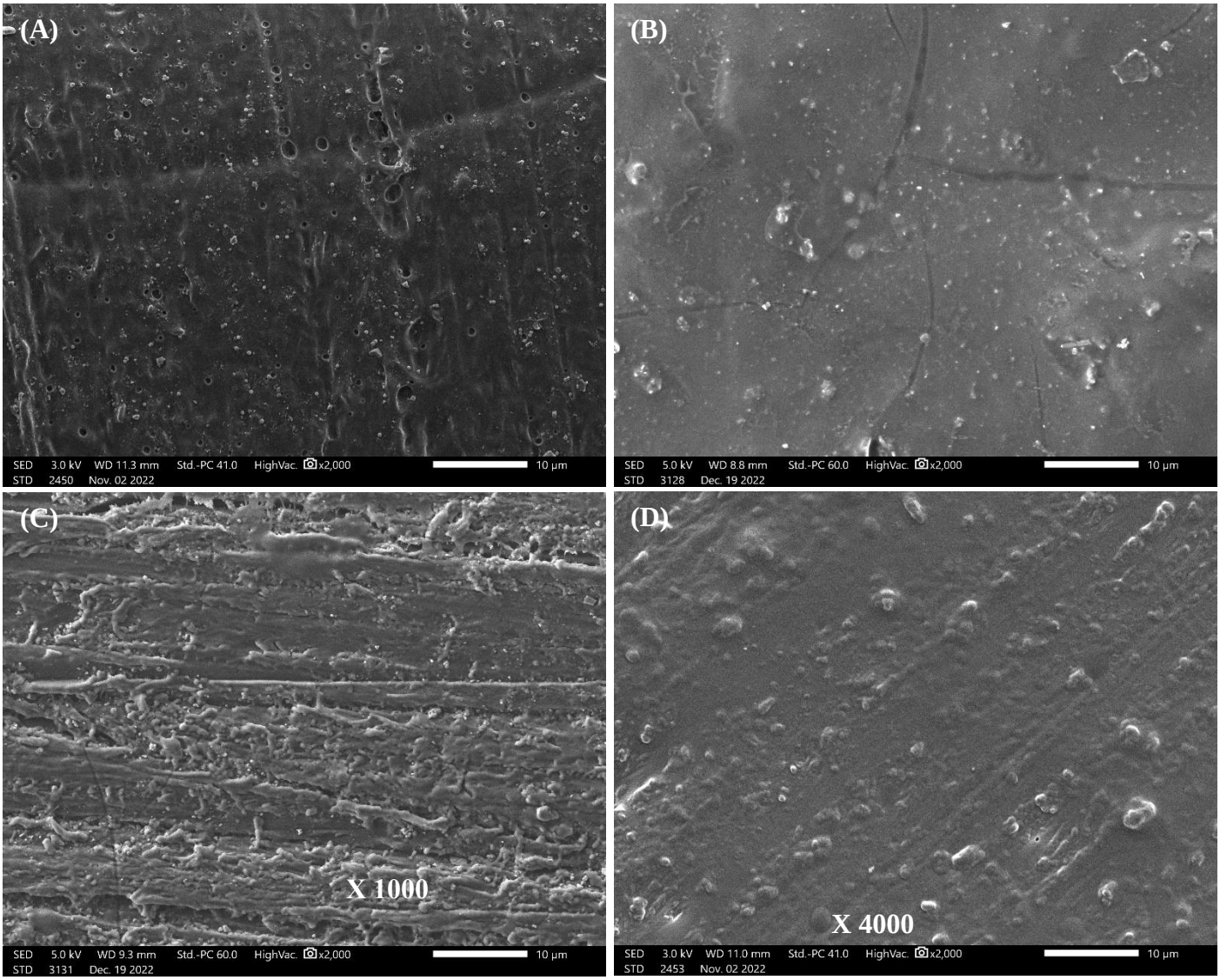


Figure 28. Analyse MEB (×2000) de l'adhésion de *E. coli* avec (A) l'HE de *E. polybractea*, (B) l'HE d'*O. mixta*, (C) l'HE de *L.briquet* et (D) Mélange 1.

Concernant *S. aureus*, l'analyse au MEB et via le logiciel Matlab a révélé que son adhésion à la surface de la résine acrylique était élevée, atteignant environ 89,02 ± 1,13%. Les traitements avec des HEs pures ont inhibé environ 60 % de cette adhésion bactérienne sur les coupons en résine acrylique. Ainsi, l'application des HEs de *L. briquet*, *O. mixta* et de *E. polybractea* a permis de réduire cette adhésion à 9,98 ± 1,85, 21,00± 0,4 et 18,45 ± 0,4, respectivement. Notamment, le mélange optimal 2, composé de 35% de l'HE d'*E. polybractea*, 30% *O. mixta* et 35% de *L. briquet*, a réussi à inhiber près de 80 % de l'adhésion de *S. aureus* à la surface de ce matériau, réduisant le pourcentage d'adhésion à 17,19 ± 0,16 % (tableau 34).

Tableau 34. Pourcentage de la surface couverte de la résine acrylique par *S. aureus* et *E. coli* non traité et traité par les trois HEs et leurs MO1 et MO2 examiné par le logiciel MATLAB.

Souches	Traitements	Pourcentage d'adhésion (%)
E. coli	Témoin	$78,81 \pm 2,71^{d}$
	HE d'*O. mixta*	$18,2 \pm 1,03^{b}$
	HE de *L. briquet*	$14,23 \pm 0,58^{a}$
	HE d'*E. polybractea*	$33,12 \pm 0,71^{c}$
	Mélange optimal 1	$11,67 \pm 0,43^{a}$
S. aureus	Témoin	$89,02 \pm 1,13^{d}$
	HE d'*O. mixta*	$21,00 \pm 0,4^{c}$
	HE de *L. briquet*	$9,98 \pm 1,85^{a}$
	HE d'*E. polybractea*	$18,45 \pm 0,4^{b}$
	Mélange optimal 2	$17,19 \pm 0,16^{b}$

Les données avec la même lettre présentent une différence non significative par le test de Tukey (ANOVA, $p < 0,05$). Les résultats sont exprimés en moyennes ± l'écart-type de trois mesures indépendantes.

N.B. le logiciel Matlab a été utilisé pour quantifier le nombre de cellules bactériennes adhérant à la surface de la résine.

Ces résultats corroborent les données obtenues par l'angle de contact, montrant une réduction de l'adhésion bactérienne sur le matériau en présence des HEs seules et de leurs mélanges optimaux. Théoriquement, l'adhésion des cellules sur des surfaces hydrophobes suit les mêmes principes que l'adsorption des protéines (Van Oss, 1995). Ces dernières, en raison de leur petite taille et de leur coefficient de diffusion élevé, adhèrent plus rapidement que les cellules bactériennes aux surfaces (Palmer et al., 2007). Les protéines adsorbées forment ensuite une couche hydrophile qui diminue l'adhésion cellulaire (Otto et al., 2001) ; qui se produit lorsque la surface cellulaire possède des récepteurs spécifiques aux protéines, comme les adhésines (Achinas et al., 2019; Cheng et al., 2007), ce qui pourrait expliquer les différences dans les pourcentages d'adhésion de *S. aureus* et *E. coli* sur la résine acrylique. Outre les paramètres d'énergie libre et d'hydrophobie des cellules bactériennes et des surfaces des matériaux, l'adhésion cellulaire peut être influencée par divers facteurs tels que la composition chimique du matériau, le temps de contact adhésif, les conditions expérimentales et le pH du milieu.

La rugosité et la topographie du substrat jouent également un rôle crucial (Hori and Matsumoto, 2010). Toute variation de ces paramètres peut directement influencer le processus d'adhésion, rendant la prédiction de l'adhésion bactérienne relativement complexe. Kim et al. (2009) ont montré que l'expression des adhésines bactériennes est affectée par la présence des HEs. Par conséquent, les HEs de *L. briquet*, *O. mixta* et de *E. polybractea* peuvent inhiber la première étape de la formation d'un biofilm. L'efficacité des mélanges optimaux des HEs contre les cellules planctoniques ou les biofilms pourrait être due à l'effet synergique entre ces trois HEs.

Plusieurs études ont démontré que les effets antimicrobiens des HEs résultent de l'interaction de tous les composants de l'huile, et non d'un seul composé (Bag and Chattopadhyay, 2015; Burt, 2004; Ju et al., 2022). Utiliser un seul composé d'une HE n'est pas suffisamment efficace pour inhiber la formation d'un biofilm (Sandasi et al., 2008). De plus, l'inhibition accrue de la formation de biofilms de *S. aureus* et *E. coli* par les mélanges optimaux 1 et 2 pourrait être due aux effets synergiques entre les composés majeurs et mineurs présents dans les HEs de *L. briquet*, d'*O. mixta* et d'*E. polybractea*. Il a été mentionné que les phénols et les alcools monoterpéniques exercent des actions synergiques contre diverses souches pathogènes (Costa et al., 2019).

Le mécanisme d'action des HEs pures et en mélanges peut-être attribué à la capacité des composés volatils à perturber l'intégrité de la membrane bactérienne. Ils peuvent également réduire l'expression de facteurs de virulence médiés par le quorum sensing, ce qui contribue à la formation de biofilms (Devanga Ragupathi et al., 2022). Ces mécanismes peuvent expliquer l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* et *E. coli* sur la surface de la résine acrylique.

Dans cette étude, le 1,8-cinéole, le p-cymène, le p-menthane-1,8-diol, l'α-pinène, le linalol et l'acétate de linalyle étaient les principaux composés des HEs examinées. Ce qui montre que les huiles étudiées comprennent de nombreuses classes de substances phytochimiques correspondant principalement au groupe des monoterpènes.

Des études antérieures ont montré que les composés monoterpéniques ont la capacité de perturber les membranes des bactéries et de supprimer l'activité de certaines enzymes (coagulase, lipase) et toxines (SEA et SEB) produites par des bactéries, notamment *S. aureus* et *E. coli*, qui contribuent à leur virulence et à leur pathogénicité en favorisant la colonisation, les lésions tissulaires et l'évasion du système immunitaire (Marchese et al., 2016).

D’autres études ont également montré que le p-cymène, le p-menthane-1,8-diol et le linalol altèrent la perméabilité de la cellule en pénétrant à travers les chaînes d'acyle gras des bicouches lipidiques membranaires, perturbent la bicouche lipidique et changent la fluidité de la membrane cellulaire (Balahbib et al., 2021; Barbosa et al., 2020). Par ailleurs, le linalol et d'autres monoterpènes représentent des composés ayant une activité inhibitrice du quorum sensing en affectant la communication entre les bactéries (Mukherji et Prabhune, 2015).

En effet, comprendre et cibler les mécanismes du quorum sensing peut contribuer au développement de stratégies plus efficaces pour prévenir ou traiter les infections liées aux biofilms. Par conséquent, les formulations anti-adhésives développées dans cette étude ont fourni une orientation théorique et expérimentale pour découvrir et affiner des agents antimicrobiens potentiels à partir des huiles essentielles marocaines, qui peuvent servir d'alternatives naturelles pour lutter contre la formation de biofilms sur la résine acrylique utilisées dans le cadre d'applications biomédicales et d'ingénierie.

V. Activité antioxydante

Au cours des deux dernières décennies, un intérêt particulier a été porté à l'exploration de nouveaux antioxydants efficaces provenant de sources naturelles afin d'éviter les dommages oxydatifs des cellules vivantes induits par des espèces chimiques réactives (ECR). Les radicaux libres représentant les principales ECR impliquées dans le processus d'oxydation, contiennent un électron non apparié sur l'orbite externe et sont très réactifs (Vijaya Lobo et al., 2010; Stadtman and Levine, 2003). Les radicaux libres tels que le radical hydroxyle (HO•), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2•-$), l'oxygène singulet ($^1O_2$), peuvent endommager les macromolécules vitales, notamment les acides nucléiques, lipides, et protéines (Jaganjac et al., 2013; Juan et al., 2021). Cet événement entraîne des lésions cellulaires et une perturbation de l'homéostasie normale (Pomatto and Davies, 2018), et déclenche un certain nombre de troubles pathologiques, tels que le cancer, le diabète et les maladies inflammatoires (Phaniendra et al., 2015; Sharma, 2014).

Par conséquent, l'utilisation d'une source externe d'antioxydants peut contribuer à maintenir un équilibre entre les radicaux libres et le système antioxydant, préservant ainsi les fonctions physiologiques.

Toutefois, il a été récemment démontré que les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), sont dangereux pour la santé humaine (Tortosa et al., 2020; Weber, 2013). Face à cette situation, les chercheurs ont récemment dirigé leur attention vers de nouveaux conservateurs, tels que le développement de nouvelles formulations antioxydantes non toxiques à partir de ressources naturelles, en particulier les HEs des plantes médicinales et aromatiques. En outre, les HEs possèdent des propriétés antioxydantes importantes, suggérant une application potentielle en tant qu'antioxydants naturels dans les industries alimentaire et pharmaceutique (Abdelkader et al., 2016; Hajlaoui et al., 2021; Loying et al., 2019).

Dans cette étude, l'activité antioxydante des HEs extraites des parties aériennes d'*E. polybractea*, *L. burnatii, L. angustifolia* et *O. mixta* a été évaluée à l'aide de deux méthodes analytiques complémentaires, à savoir le test du DPPH et le test du pouvoir réducteur du fer. Ces méthodes utilisent divers mécanismes pour évaluer l'activité antioxydante. En effet, le test DPPH évalue la capacité de piégeage des radicaux libres (El Hachlafi et al., 2023a; Jeddi et al., 2023a), tandis que le test du pouvoir réducteur mesure la capacité de réduction ferrique (Benkhaira et al., 2022; El Moussaoui et al., 2019). Cette approche permet d'obtenir des résultats complémentaires et une compréhension globale du pouvoir antioxydant des HEs examinées.

1. Piégeage du radical libre DPPH

La méthode de DPPH• est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des produits naturels, en particulier les HEs. Ce test consiste à réduire le DPPH d'une couleur violette à une couleur jaune en présence d'un antioxydant, qui fournit des atomes d'hydrogène au radical.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire révèlent que les HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta, L. burnatii* et *L. angustifolia,* possèdent la capacité de réduire le radical violet stable DPPH• en radical jaune DPPH-H, jusqu'à 84,46 ± 1,64%, 75 ,23 ± 2,65%, 68 ,76 ± 2,28 % et 63,94± 1,64% à la concentration de 5,29 mg/mL, respectivement (figure 29). Il convient de noter que les HEs testées ont des capacités de piégeage des radicaux libres différentes. En outre, un effet antioxydant dépendant de la concentration a été constaté pour les quatre échantillons examinés.

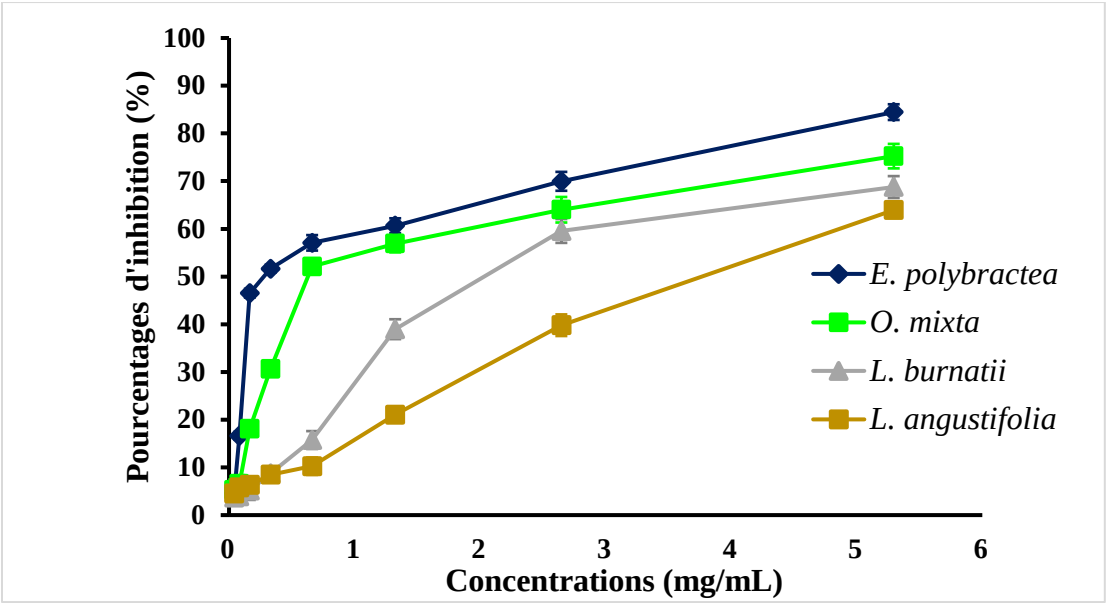


Figure 29. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les HEs étudiées.
*Les résultats sont exprimés en moyennes de trois essais (n= 3) avec ± l'écart-type.

Les résultats de la CI_{50} (tableau 35) ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) dans l'activité anti-radicalaire des HEs d'*E. polybractea* (CI_{50} = 0,3014 ± 0,029 mg/ml), *L. burnatii* (CI_{50} = 2,1723 ± 0,108 mg/ml), *L. angustifolia* (CI_{50} = 3,9647 ± 0,10 mg/ml), *O. mixta* (CI_{50} = 0,6281± 0,01 mg/ml), ainsi que des antioxydants synthétiques, à savoir l'acide ascorbique (CI_{50} = 0,027±0,006 mg/ml) et le BHT (CI_{50} = 0,094± 0,007 mg/mL). En fait, les quatre HEs testées étaient moins puissantes que les antioxydants de référence ($p < 0,05$).

Tableau 35. Valeurs de CI_{50} des HEs et des standards contre le radical DPPH.

HEs / Standards	CI_{50}(mg/ml)
E. polybractea	0,3014± 0,029^{c}
O. mixta	0,6281± 0,01^{d}
L. burnatii	2,1723± 0,108^{e}
L. angustifolia	3,9647± 0,10^{f}
BHT	0,094± 0,007^{b}
Acide ascorbique	0,027±0,006^{a}

*Les résultats sont exprimés en moyennes de trois essais (n= 3) avec ± l'écart-type. *Les valeurs indiquées avec les mêmes lettres révèlent que la différence n'est pas significative (P< 0,05). * les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

2. Pouvoir réducteur ferrique

La réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ferreux (Fe^{2+}) par les HEs est un autre indicateur souvent employé pour évaluer les propriétés antioxydantes. Ce test repose sur la réduction d'un complexe Fe^{3+} de tripyridyltriazine (Fe (TPTZ)$^{3+}$) en Fe (TPTZ)$^{2+}$, avec l'apparition d'une couleur bleue verdâtre, en présence d'un antioxydant. D'après la figure 30, le pouvoir réducteur des HEs étudiées et des antioxydants synthétiques varie selon l'ordre suivant : Acide ascorbique > BHT > *E. polybractea* > *O. mixta* > *L. burnatii* > *L. angustifolia*.

L'huile essentielle d'*E. polybractea* a montré le pouvoir réducteur le plus important, avec une CE_{50} de 1,26 ± 0,183 mg/ml. Par ailleurs, une activité antioxydante modérée a été observée pour l'HE d'*O. mixta*, avec une CE_{50} de 4,58 ± 0,176 mg/ml. En revanche, les HEs de *L. burnatii* et *L. angustifolia* ont montré un faible pouvoir réducteur, avec des concentrations efficaces (CE_{50}) de 11,04 ± 0,197 mg/ml et 13,19 ± 0,314 mg/ml, respectivement. Généralement, les HEs examinées demeurent moins puissantes que les agents antioxydants synthétiques, le BHT (CI_{50}= 1,10 ± 0,135mg/ml) et l'acide ascorbique (CI_{50}= 0,172±0,111 mg/ml) ($p < 0,05$).

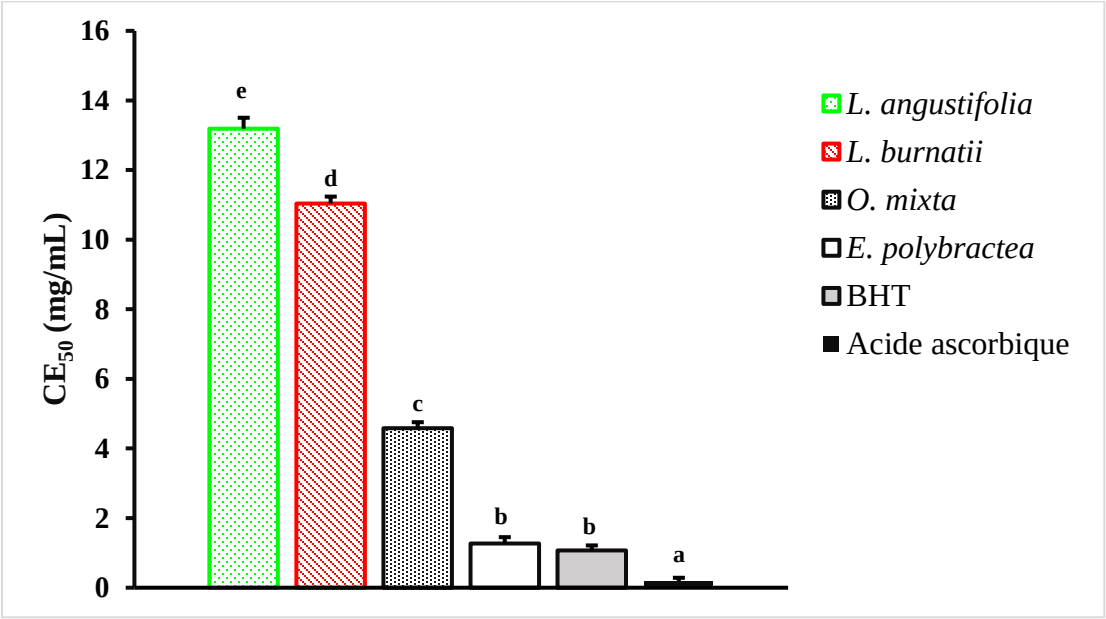


Figure 30. Pouvoir réducteur (CE_{50}) des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta*, comparée aux antioxydants standards (acide ascorbique et BHT).

Les résultats sont exprimés en moyennes de trois essais (n= 3) avec ± l'écart-type. Les données avec la même lettre montrent une différence non significative par le test de Tukey (ANOVA, p < 0,05).

3. Discussion

Au cours des dernières années, l'utilisation d'antioxydants naturels dans les produits alimentaires a suscité un grand intérêt, en raison des préoccupations toxicologiques associées à la consommation d'antioxydants synthétiques (Lourenço et al., 2019). Dans ce contexte, les PAMs, notamment leurs composés bioactifs, sont étudiées en vue d'évaluer leurs propriétés antioxydantes. Il devient ainsi pertinent d'examiner l'activité antioxydante des HEs, vu leur utilisation répandue dans l'industrie alimentaire (Baj et al., 2018; Ebrahimi and Khosravi-Darani, 2013; Mutlu-Ingok et al., 2020).

Dans notre investigation, les HEs extraites des parties aériennes d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* ont démontré un pouvoir antioxydant remarquable à travers les deux tests *in vitro* employés. En effet, les huiles examinées ont révélé une capacité antioxydante plus importante par la méthode DPPH que par le test de pouvoir réducteur du fer.

La variation de l'activité antioxydante entre les quatre huiles étudiées pourrait être due à leurs différents profils phytochimiques (El Hachlafi et al., 2023c; Mrabti et al., 2023).

En outre, la capacité antioxydante des HEs pourrait être attribuée à divers mécanismes, étant donné leur complexité chimique caractérisée par des groupes fonctionnels, une polarité et des comportements chimiques différents ; par conséquent, afin de déterminer leur efficience, divers tests analytiques complémentaires doivent être employés.

Nos résultats concordent avec ceux des travaux antérieurs qui ont témoigné l'activité antioxydante des HEs d'*E. polybractea*, *L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* à l'aide de divers tests antioxydants (Blažeković et al., 2018; Caprari et al., 2023; Ouedrhiri et al., 2018; Sharma et al., 2022; Slimani et al., 2022). La capacité antioxydante de ces quatre HEs peut être due en partie à leur contenu élevé en composés phénoliques.

Selon la littérature, le potentiel antioxydant des HEs d'*E. polybractea, L. burnatii*, *L. angustifolia* et *O. mixta* est fortement lié à leur composition chimique (El Mihyaoui et al., 2023; Ghazghazi et al., 2019; Lesage-Meessen et al., 2015; Moussa et al., 2023). Ces huiles pourraient agir en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et d'oxygène singuliers. En effet, elles renferment un taux élevé d'hydrocarbures monoterpéniques tels que le *p*-cymène, l'α-pinène et le limonène, ainsi que des monoterpènes oxygénés telque le 1,8-cinéole, le linalol, l'acétate de linalyle et le camphre ; reconnus pour leur action inhibitrice notable sur le processus d'oxydation (Mazra Burits et al., 2001; Hajlaoui et al., 2016; Jeddi et al., 2023a; Shah and Mehta, 2018; Tepe et al., 2004).

Ces molécules peuvent agir seules et /ou en synergie en tant qu'agents antioxydants naturels, exerçant un rôle préventif pour la santé humaine contre divers troubles associés au stress oxydatif (De Groot and Schmidt, 2016; Lee et al., 2002; Ola and Sofolahan, 2021).

Plusieurs investigations ont rapporté l'activité antioxydante de l'HE d'*O. mixta*. En effet, une étude réalisée sur l'huile d'*O. mixta* provenant de la région de Taounate a révélé un effet antioxydant important contre le radical DPPH, avec une CI_{50} de 0,59 ± 0,11 mg/ml, comparée à celle de l'hydroxytoluène butylé (BHT) (CI_{50} = 33,23 ± 0,01 µg/ml) (Ouedrhiri et al., 2018). En outre, l'HE d'*O. mixta,* collectée dans la région de Casablanca, a également montré un potentiel antiradicalaire remarquable, avec une CI_{50} de 0,342±0,002 mg/ml, par rapport à l'acide ascorbique (0,1±0,004 mg/ml) (Elouaddari et al., 2019b). Toutefois, les HEs d'*O. mixta* provenant de la région de Bani Hassan ont exercé une activité antiradicalaire modérée, avec une CI_{50} de 1,58 ±0,012 mg/ml par rapport au BHT (CI_{50} = 43,13 ± 0.011 µg/ml) (El Mihyaoui et al., 2023). De telles activités pourraient être dûes à la composition chimique de l'HE d'*O. mixta*, principalement ses principaux composants tels que le *p*-menthane-1,8-diol, l'*α*-pinène et le germacrène D, ou à leur synergie.

Par ailleurs, de nombreuses recherches ont démontré que les HEs de espèces d'*Eucalyptus* possèdent des propriétés antioxydantes (Said et al., 2016; Sharma et al., 2022; Singh et al., 2009). La capacité antioxydante de l'HE d'*E. polybractea*, examinée à l'aide du test de piégeage du radical DPPH et du test de pouvoir réducteur, a révélé une activité antioxydante très importante. Cette activité est certainement associée au profil phytochimique de cette HE, qui est riche en composés monoterpéniques oxygénés tels que le 1,8-cinéole et le linalol. En effet, de nombreuses recherches ont montré les activités antioxydantes des huiles riches en ces molécules (Assaggaf et al., 2022; Harkat-Madouri et al., 2015; Jabir et al., 2018; Kouki et al., 2023). En outre, le potentiel de l'huile extraite de la partie aérienne d'*E. polybractea* à piéger le radical libre DPPH est en concordance avec ce qui a été indiqué dans d'autres travaux (Liu et al., 2023; Polito et al., 2023; Sharma et al., 2022). En effet, Sharma et al., (2022) ont trouvé un effet antioxydant important, tandis que Liu et al., (2023) ont révélé une activité antioxydante modérée de l'HE d'*E. polybractea.*

Concernant *L. burnatii*, plusieurs travaux ont démontré les propriétés antioxydantes de ses HEs. En effet, l'HE de *L. burnatii* provenant de Zagreb (Croatie) a montré un potentiel antioxydant remarquable contre le radical DPPH, avec une CI_{50} de 21,58 ± 0,26 mg/ml, comparée à celle du BHT (CI_{50} = 0,010 ± 0,001 mg/ml), utilisé comme contrôle positif (Blažeković et al., 2018).

En outre, les HEs de la même plante récoltée en Italie ont démontré une activité antiradicalaire modérée, avec une CI_{50} de 28,57 ± 0,012 mg/ml, par rapport au Trolox (CI_{50} = 0,022 ± 0,011 mg/ml) (Pistelli et al., 2017). Cependant, l'HE extraite de *L. burnatii*, originaire de Štip, Macédoine du Nord, a manifesté une activité antiradicalaire légèrement faible, avec une CI_{50} de 47,4 ± 1,8 mg/ml, comparée à celle du BHT (CI_{50} = 89,21 ± 2,84 µg/ml) (Pljevljakusic et al., 2023).

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'HE de *L. burnatii* est généralement déterminée par les interactions entre les composés bioactifs mineurs et majeurs avec différents mécanismes d'action. En outre, cette activité pourrait être due à sa teneur élevée en linalol et acétate de linalyle.

Concernant l'HE de *L. angustifolia*, nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans plusieurs études, notamment celle de Garzoli et al. (2021) qui a rapporté qu'elle présente une forte activité antiradicalaire contre les radicaux DPPH et ABTS, avec des CI_{50} respectives de 7,75 ± 0,1 et 18,71 ± 2,15 µg/ml. En outre, l'HE de *L. angustifolia* a montré une capacité antioxydante équivalente au Trolox de 5,4 ± 3,72 µmol/mg (Garzoli et al., 2021). Par ailleurs, Kıvrak (2018) a évalué les activités antioxydantes de différents cultivars de *L. angustifolia* (cultures de lavande et de lavandin). Les résultats du test de blanchiment du β-carotène ont révélé que l'inhibition la plus élevée a été observée chez le cultivar *L. angustifolia* Yubileina (23,67 ± 0,14 µg/ml). Alors que dans le test du DPPH, les cultivars *Lavandula x intermedia* ont présenté l'effet de piégeage des radicaux le plus élevé (CI_{50} = 89,81 ± 0,17 µg/ml). De plus, le cultivar *L. angustifolia* Sevtopolis a montré l'action antiradicalaire la plus élevée, selon le test ABTS, avec une valeur d'inhibition de 61,23 ± 0,11 µg/ml. En outre, Caprari et al., (2023) ont évalué l'activité antioxydante des HEs de *L. angustifolia* récoltées dans quatre zones géographiques différentes à l'aide du test DPPH. Les résultats ont montré des fluctuations significatives dans la capacité antioxydante des échantillons testés avec des valeurs de CI_{50} comprises entre 26,26 mg/ml et 49,63 mg/ml. Cet événement peut être lié aux variations du contenu chimique des HEs de *L. angustifolia*, qui dépendent des conditions biogéographiques où les plantes poussent.

Comme mentionné précédemment, les HEs étudiées représentent une source précieuse d'antioxydants naturels susceptibles de remplacer les antioxydants synthétiques qui deviennent de plus en plus nocifs pour la santé humaine. En effet, grâce à leur capacité puissante à neutraliser les radicaux libres, les HEs peuvent contribuer à la prévention et au traitement de diverses maladies telles que le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives, les affections cardiovasculaires et les troubles auto-immuns.

VI. Formulation par le plan de mélange : activités anti-oxydantes

1. Plan d'expérimentation

Le plan d'expérimentation, comprenant les différentes combinaisons des trois HEs testées, à savoir les HEs d'*E. polybractea* (EPHE), d'*O. mixta* (OMHE*)* et de *L. burnatii* (LBHE), ainsi que les valeurs des deux réponses enregistrées (DPPH-$_{IC50}$ et Pouvoir réducteur-$_{CE50}$), est résumé dans le tableau 36.

Tableau 36. Diverses combinaisons générées par le plan de mélange choisi et les réponses expérimentales obtenues pour chaque essai.

N° d'expérience[a]	*E. polybractea* (EPHE)	*O. mixta* (OMHE)	*L. burnatii* (LBHE)	Réponses observées [b]	
				DPPH $_{CI50}$ (mg/ml)	Pouvoir réducteur CE_{50} (mg/ml)
1	1	0	0	0,3014± 0,029	1,262± 0,183
2	0	1	0	0,6281± 0,01	4,5801± 0,176
3	0	0	1	2,1723± 0,108	11,043± 0,197
4	0,5	0,5	0	0,2765±0,004	1,315± 0,122
5	0,5	0	0,5	0,5962±0,11	4,853± 0,14
6	0	0,5	0,5	1,0235±0,28	6,921±1,13
7	0,333	0,333	0,333	0,2431±0,02	0,796± 0,021
8	0,333	0,333	0,333	0,215± 0,081	0,972± 0,041
9	0,333	0,333	0,333	0,1923± 0,049	0,816 ± 0,06
10	0,667	0,167	0,167	0,1738± 0,02	1,272± 0,93
11	0,167	0,667	0,167	0,338 ±0,057	3,0851± 1,12
12	0,167	0,167	0,667	0,9235±0,089	4,987± 1,05
Acide ascorbique				0,027±0,006	0,172±0,110
BHT				0,094±0,007	1,10±0,134

[a] Les expériences ont été réalisées après randomisation. [b] Chaque réponse est la moyenne de trois répétitions (n=3) avec ± l'écart-type.

Les expériences ont été randomisées, et chaque réponse enregistrée représente la moyenne de trois répétitions indépendantes.

Les résultats ont révélé que les tests d'activité antioxydante (le DPPH-IC_{50} et le pouvoir réducteur-CE_{50}) varient respectivement de 0,1738± 0,02 à 2,1723 ± 0,108 mg/ml et de 0,796 ± 0,021 à 11,043 ± 0,197 mg/ml (tableau 36). L'analyse des résultats a montré que la combinaison équi-proportionnelle des trois HEs, ainsi que le mélange ternaire (0,667 : *E. polybractea* /0,167 : *O. mixta* /0,167 : *L. burnatii*) présentaient la meilleure activité antioxydante, avec des valeurs de CI_{50} et de CE_{50} inférieures à celles des HEs individuelles et des mélanges binaires.

2. Validation statistique du modèle postulé

Les résultats expérimentaux obtenus ont été soumis à une analyse statistique à l'aide de l'analyse de la variance (ANOVA) afin de vérifier le modèle adopté, représentant la relation entre les constituants et les réponses.

2.1 Piégeage du radical libre DPPH•

Les résultats de l'analyse de variance pour la réponse de la DPPH $_{CI50}$ (tableau 37) révèlent que l'effet principal de la régression linéaire est significatif, puisque la probabilité de la signification du risque (*p*-value) est inférieure à 0,05. En effet, le calcul du rapport $F_{(R/r)}$ (369,23) a révélé une valeur plus élevée que la valeur théorique de $F_{(0,05\ ;\ 6,5)}$ au niveau de confiance de 95%.

Tableau 37. Analyse de la variance (ANOVA) du modèle ajusté.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport *F*	*p*-value
Régression	6	3,6335346	0,605589	369,2317	<0,0001*
résidus	5	0,0082007	0,001640		
Total	11	3,6417352			
R^2	99,95%				
R^2 ajusté	99,83%				

* : statistiquement significatif ; R^2 : Coefficient de détermination.

L'importance d'un modèle augmente avec les valeurs du coefficient de détermination (R^2) et du (R^2 $_{ajusté}$). Par conséquent, selon le tableau 37, les coefficients de détermination (R^2) étaient de 99,95%, tandis que le $R^2_{ajusté}$ était égal à 99,83%. Ce qui reflète une bonne concordance entre les données expérimentales et celles attendues du modèle mathématique supposé.

Pour confirmer ces résultats, le graphique (figure 31) illustre une courbe linéaire des valeurs observées en fonction des valeurs attendues.

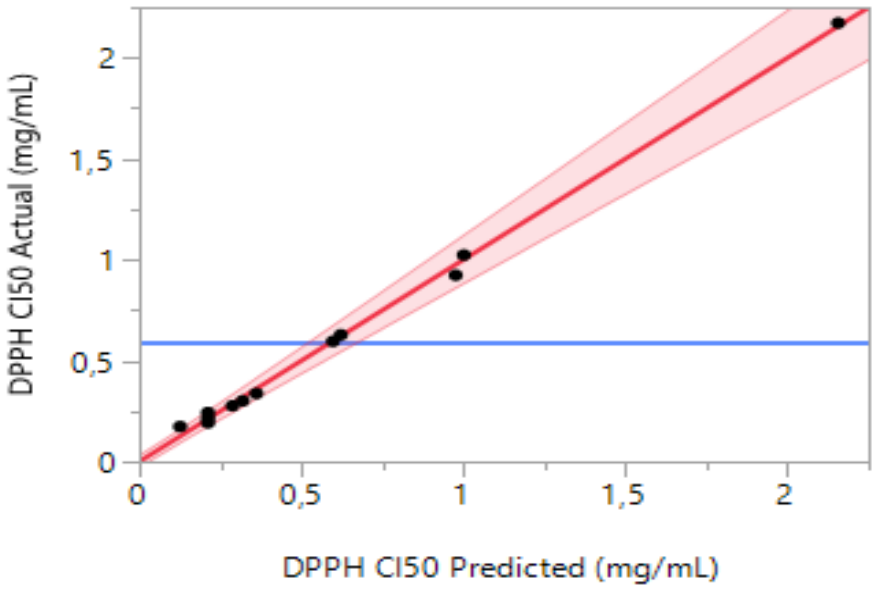


Figure 31. Courbe des valeurs de DPPH CI_{50} observées en fonction des valeurs prédites.

La figure 31 montre des lignes rouges qui représentent la courbe des valeurs de DPPH $_{CI50}$ observées en fonction des valeurs prédites, tandis que les lignes bleues horizontales correspondent à la moyenne des valeurs observées. La zone ombrée représente les intervalles de confiance de la courbe de régression générée par les modèles choisis.

2.2 Pouvoir réducteur ferrique

D'après l'analyse de la variance du modèle ajusté, l'impact principal de la régression linéaire est statistiquement significatif pour la réponse étudiée, puisque leur probabilité de signification du risque (*p*-value) est inférieure à 0,05 (0,0001*) (tableau 38).

Evidemment, le rapport $F_{(R/r)}$ calculé pour cette réponse ($F_{(R/r)}$ = 69,08), est supérieur à la valeur théorique de $F_{(0,05\ ;\ 6,5)}$ au niveau de confiance de 95 %.

Les coefficients de détermination (R^2) et ($R^2_{\ ajusté}$) obtenus sont respectivement de 99,82% et 99,32%. Ces valeurs sont très satisfaisantes et témoignent d'une excellente concordance entre les valeurs expérimentales et prédites du modèle mathématique adapté.

Ces résultats ont été confirmés par le graphique de la figure 32, illustrant une courbe linéaire des valeurs observées en fonction des valeurs prédites.

Tableau 38. Analyse de la variance (ANOVA) du modèle ajusté.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport *F*	*p*-value
Régression	6	108,32621	18,0544	69,0825	**0,0001***
résidus	5	1,30672	0,2613		
Total	11	109,63294			
R^2	99,82%				
R^2 ajusté	99,32%				

* : statistiquement significatif ; R^2 : Coefficient de détermination.

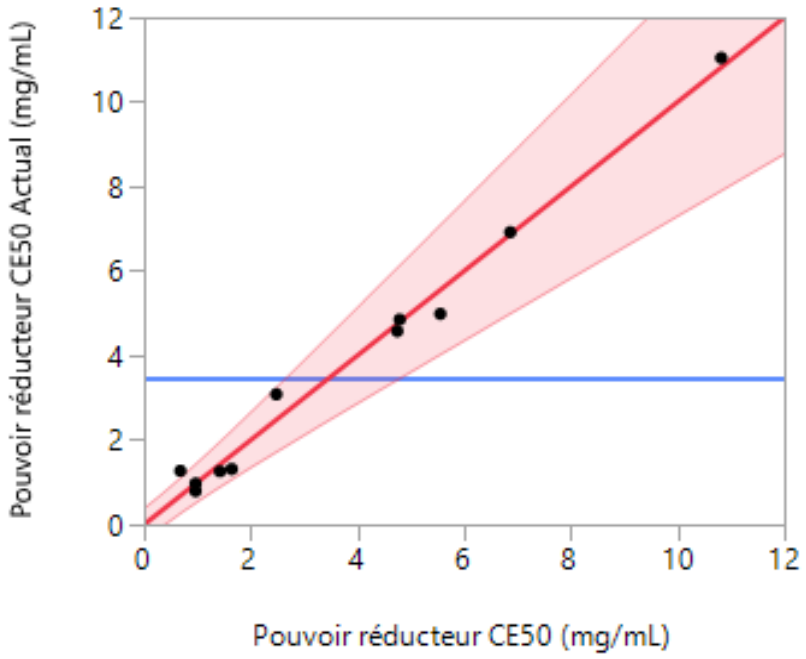


Figure 32. Représentation des valeurs observées en fonction des valeurs prédites.

En effet, les lignes rouges de la figure 32 représentent la courbe des valeurs des CE_{50} du pouvoir réducteur observées en fonction des valeurs prédites. Les lignes bleues horizontales représentent la moyenne des valeurs observées. La zone ombrée représente les intervalles de confiance de la courbe de régression générée par les modèles choisis.

3. Effets des facteurs et modèles ajustés

3.1 Piégeage du radical libre DPPH•

Les effets de tous les facteurs examinés, ainsi que la probabilité observée (*p*-value) et les valeurs statistiques du test *t-student*, sont répertoriés dans le tableau 39. Les coefficients du modèle mathématique ont été considérés statistiquement significatifs lorsque leur probabilité observée (*p-value*) était inférieure à 0,05. En revanche, ceux dont la valeur était supérieure à 0,05 ont été exclus du modèle présumé.

Tableau 39. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté et leur signification statistique (*p*-value).

Terme	Coefficients	Estimation	Écart-type	Rapport t	*P*-value
E. polybractea	σ_1	0,3189398	0,039113	8,15	0,0005*
O. mixta	σ_2	0,6218761	0,039113	15,90	<0,0001*
L. burnatii	σ_3	2,1563126	0,039113	55,13	<0,0001*
*E. polybractea * O. mixta*	σ_{12}	-0,730368	0,196953	-3,71	0,0139*
*E. polybractea * L. burnatii*	σ_{13}	-2,559495	0,196953	-13,00	<0,0001*
*O. mixta * L. burnatii*	σ_{23}	-1,551223	0,196953	-7,88	0,0005*
*E. polybractea * O. mixta * L. burnatii*	σ_{123}	-7,623455	1,07137	-7,12	0,0009*

∗Statistiquement significatif à $p < 0,05$.

L'analyse des résultats de la réponse DPPH-$_{CI50}$ (tableau 39) révèle que tous les termes du modèle mathématique adapté, à savoir σ_1, σ_2, σ_3, σ_{12}, σ_{13} et σ_{123} sont statistiquement significatifs. Ces résultats affirment que le potentiel antioxydant du radical DPPH dépend de l'ensemble des interactions entre les HEs testées. Par conséquent, le modèle ajusté décrivant la réponse en termes de trois constituants a été exprimé par l'équation mathématique suivante (Eq. 6) :

$$Y_{DPPH\text{-}CI50} = 0,318\ E_1 + 0,621\ E_2 + 2,156\ E_3 - 0,730\ E_1E_2 - 2,559\ E_2E_3 - 1,55\ E_2E_3 - 7,623\ E_1E_2E_3 + \varepsilon \quad (6)$$

3. 2. Pouvoir réducteur ferrique

Le tableau 40 regroupe les effets de tous les facteurs examinés avec leurs valeurs statistiques du test *t*-student correspondants et la probabilité observée (*p*-value). Les coefficients statistiquement significatifs pour la réponse du pouvoir réducteur-$_{CE50}$ sont ceux qui indiquent les effets des composants pures (σ_1, σ_2 et σ_3), ainsi que le terme d'interaction ternaire σ_{123}.

En revanche, les coefficients des termes d'interaction binaires (σ_{12}, σ_{13} et σ_{23}) ne sont pas significatifs ($p > 0,05$) et n'indiquent aucun impact sur la réduction du fer. Ces résultats affirment que le potentiel antioxydant dépend de tous les termes du modèle mathématique adapté, à l'exception de ceux reflétant les interactions binaires. En effet, après avoir exclu tous les coefficients non significatifs du modèle postulé, le modèle mathématique représentant la réponse en fonction de trois composants testés s'exprime par l'équation suivante (7):

$$Y_{\text{Pouvoir réducteur-CE50}} = 1,423\ E_1 + 4,74\ E_2 + 10,819\ E_3 - 82,521\ E_1\ E_2\ E_3 + \varepsilon \qquad (7)$$

Tableau 40. Coefficients de régression estimés pour le modèle ajusté et leur signification statistique (*p*-value).

Terme	Coefficient	Estimation	Écart-type	Rapport t	P-value
E. polybractea	σ_1	1,4239306	0,493724	2,88	0,0344*
O. mixta	σ_2	4,7468669	0,493724	9,61	0,0002*
L. burnatii	σ_3	10,819295	0,493724	21,91	<0,0001*
*E. polybractea * O. mixta*	σ_{12}	-5,766801	2,48617	-2,32	0,0681
*E. polybractea * L. burnatii*	σ_{13}	-5,32155	2,48617	-2,14	0,0853
*O. mixta * L. burnatii*	σ_{23}	-3,676077	2,48617	-1,48	0,1993
*E. polybractea * O. mixta * L. burnatii*	σ_{123}	-82,5269	13,52406	-6,10	0,0017*

∗Statistiquement significatif à $p < 0,05$.

4. Optimisation de la formulation et étude de désirabilité

L'optimisation adoptant la méthodologie de conception des mélanges implique la recherche d'une modulation optimale des variables, menant à la meilleure valeur des réponses étudiées. Puisque les modèles qui sont statistiquement validés sont prédictifs, ces résultats optimaux ne coïncident pas forcément avec ceux enregistrés dans les 12 expériences effectuées.

Néanmoins, ils peuvent être prédits avec précision dans le domaine expérimental analysé (Voinovich et al., 2020). Afin d'obtenir des informations précieuses sur les meilleures valeurs réalisables, le point de départ était les meilleures valeurs obtenues lors de l'exécution des tests (Aboulghazi et al., 2022). Ainsi, les meilleurs résultats trouvés étaient 0,1738 ± 0,02 et 0,796 ± 0,021 mg/ml pour les valeurs de CI_{50} du DPPH et CE_{50} du pouvoir réducteur, respectivement.

Donc, une formulation d'HEs assurant des réponses meilleures ou égales à ces valeurs sera prise en considération.

Le tracé du contour et de la surface 3D (tracés de mélange 2D et 3D, respectivement) (figures 33 et 35) montrent le mélange approprié des trois constituants, à savoir *E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, conduisant à la maximisation des deux réponses (CI_{50} du DPPH et CE_{50} du Pouvoir réducteur). Ce graphique démontre la relation entre chacune des deux réponses et les proportions de chaque agent antioxydant qui les influencent (Nouioura et al., 2023; Soussi et al., 2022). Il est généré par le logiciel Design-Expert sur la base des courbes d'iso-réponses, lesquelles sont idéales pour étudier les conditions optimales permettant d'atteindre les meilleures valeurs possibles.

La zone bleue foncée représentant des valeurs CI_{50} et CE_{50} plus faibles et un potentiel antioxydant plus élevé, tandis que la couleur jaune à rouge foncé signifie des valeurs CI_{50} et CE_{50} moyennes à élevées.

4.1 Optimisation du CI_{50}-DPPH

Les tracés de contour et de surface de la réponse CI_{50}-DPPH (figure 33) permettent d'explorer les différentes activités relatives aux diverses proportions des trois HEs testées. Les résultats de l'analyse des diagrammes de mélange 2D et 3D ont révélé que la zone de compromis optimale (zone bleu foncé) correspondant à la valeur de CI_{50}-DPPH souhaitée (0,1738 mg/ml) nécessite l'utilisation d'une combinaison ternaire composé des HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et *L. burnatii* (LBHE). Ces résultats ont été confirmés par le test de désirabilité (figure 34), dans lequel la meilleure valeur réalisable pour la CI_{50}-DPPH est égale à 0,088 mg/ml, avec un pourcentage de compromis de 99,8 %. Ceci a été obtenu en réalisant un mélange ternaire optimal composé d'environ 53 % de l'HE d'*E. polybractea* (EPHE), 29 % d'HE d'*O. mixta* (OMHE) et 18 % d'HE de *L. burnatii* (LBHE). En comparant les résultats de la combinaison optimale avec des antioxydants synthétiques, on constate qu'elle est supérieure à celle fournie par le BHT (0,094 ± 0,007 mg/ml) et moins efficace que celle obtenue avec l'acide ascorbique (0,027 ± 0,006 mg/ml).

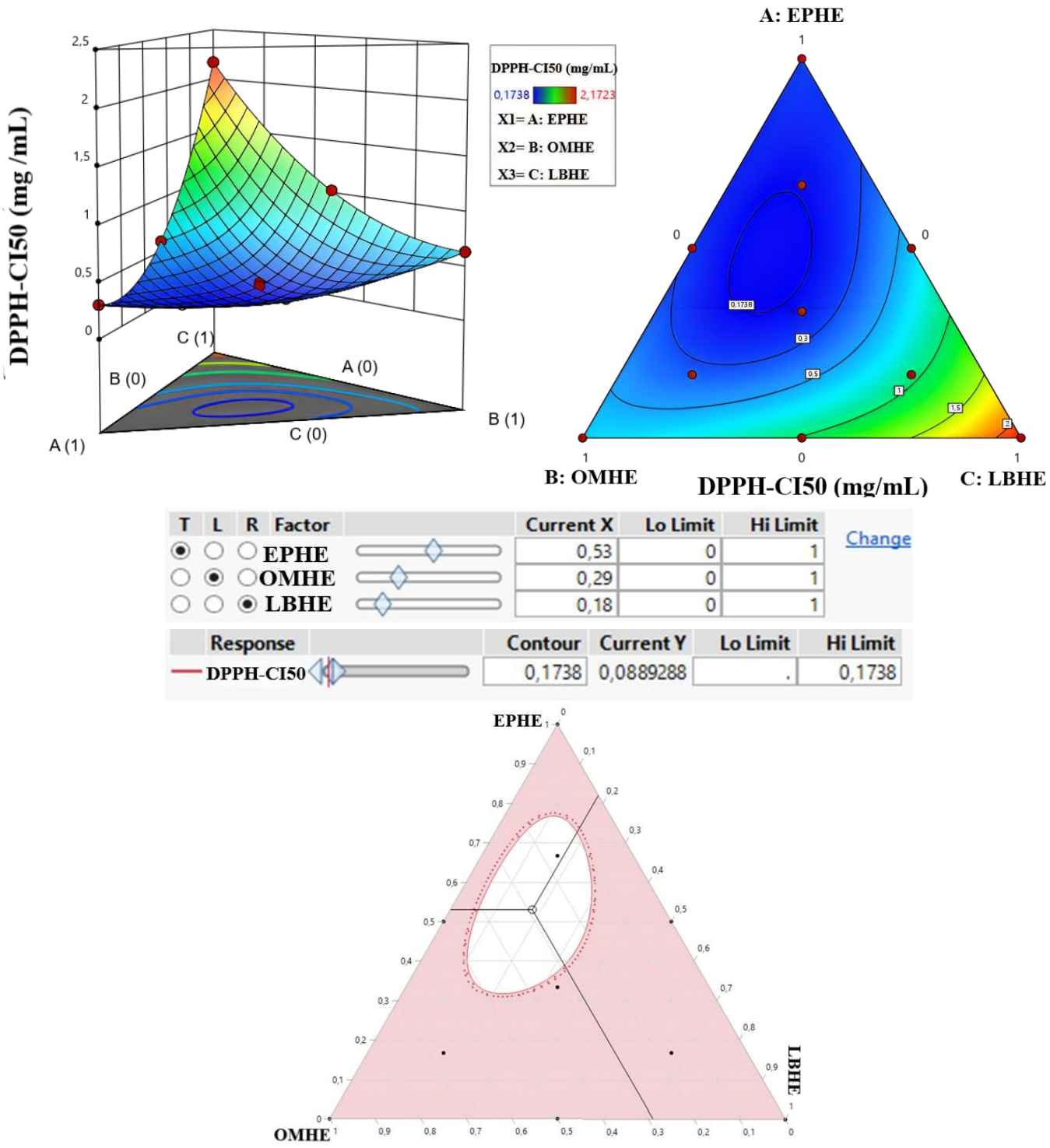


Figure 33. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la meilleure valeur de la réponse DPPH-CI_{50} (mg/mL) en fonction des trois composants.

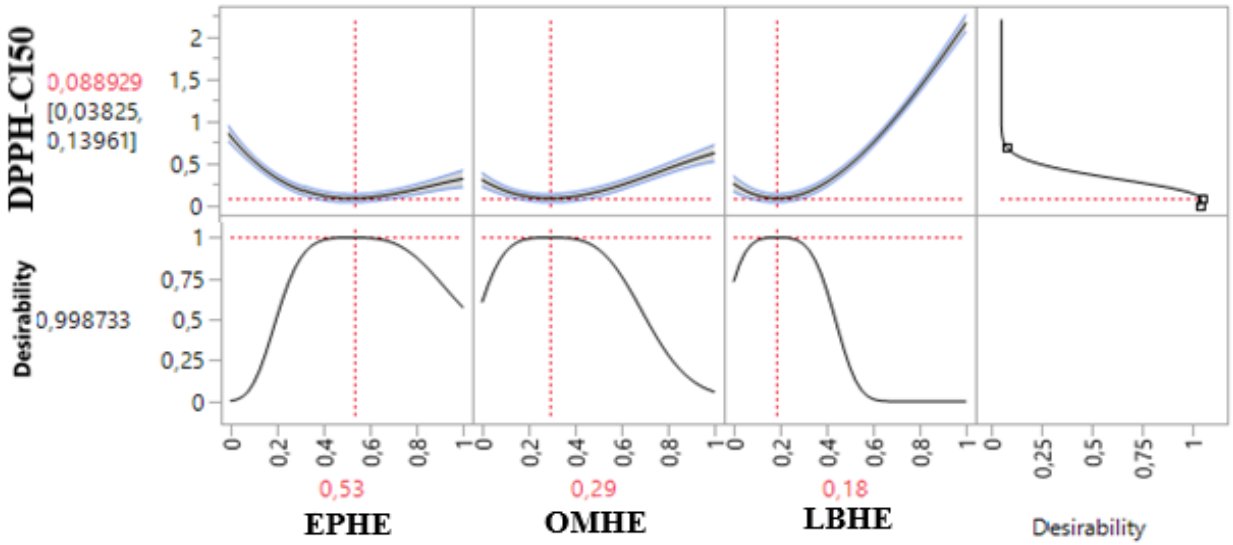


Figure 34. Profil de désirabilité illustrant les proportions précises des HEs d'*E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et de *L. burnatii* (LBHE), conduisant à la valeur optimale de la réponse DPPH-$_{CI50}$.

4.2 Optimisation du pouvoir réducteur

Les tracés des contours et la surface 3D (figure 35) montrent la réponse du pouvoir réducteur (CE_{50}) obtenue en utilisant différentes proportions de trois HEs étudiées. L'illustration graphique des mélanges en 2D et 3D indique que le mélange recommandé pour la réponse du pouvoir réducteur (CE_{50}) comprend également les trois huiles examinées, à savoir *E. polybractea* (EPHE), *O. mixta* (OMHE) et *L. burnatii* (LBHE). Cette combinaison peut produire une valeur d'environ 0,796 mg/ml. En outre, la fonction de désirabilité (figure 36) confirme ces résultats et suggère qu'un mélange composé de 46 % d'HE de *E. polybractea* (EPHE), 34 % de *O. mixta* (OMHE) et 20 % de *L. burnatii* (LBHE) conduit à la meilleure valeur du pouvoir réducteur réalisable (CE_{50}=0,188 mg/ml), avec une désirabilité de 99,9 %. Il a également été noté que la valeur optimale du pouvoir réducteur est meilleure que celle fournie par le BHT (CE_{50}=1,10 ± 0,134 mg/ml), mais reste légèrement inférieure à celle obtenue avec l'acide ascorbique (CE_{50}=0,172 ± 0,110 mg/ ml).

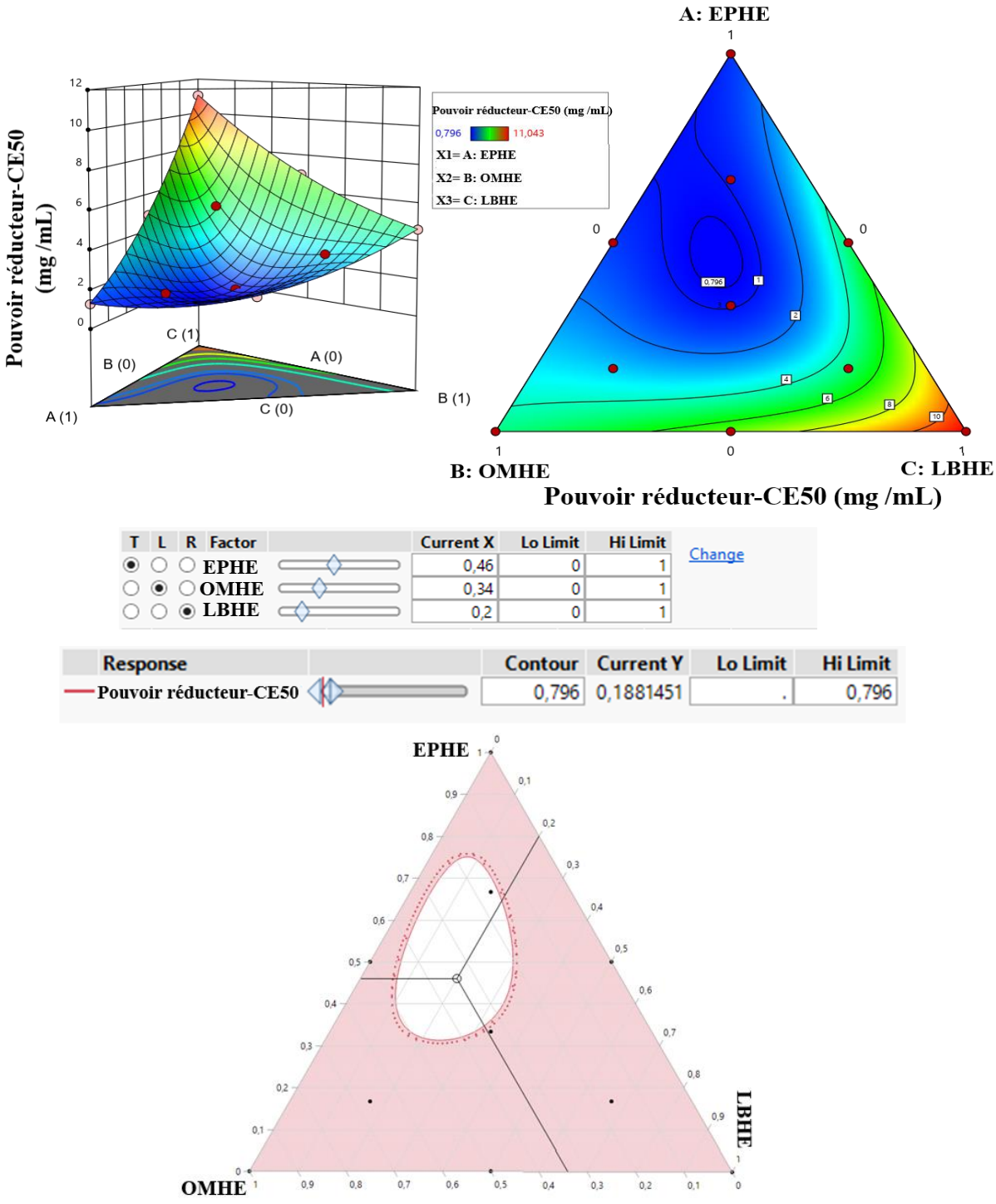


Figure 35. Profil de mélange 2D et 3D, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la meilleure valeur de la réponse pouvoir réducteur (CE_{50}) en fonction des trois composants.

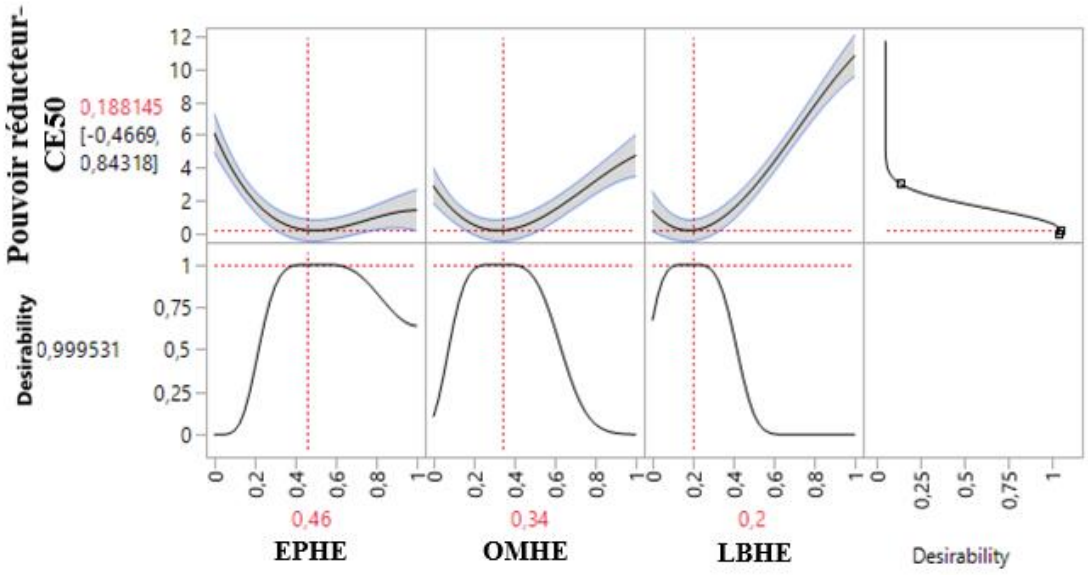


Figure 36. Profil de désirabilité montrant les proportions optimisées des trois HEs étudiées conduisant à la valeur optimale de la réponse du pouvoir réducteur (CE_{50}).

4.3 Optimisation simultanée des deux réponses

Outre sa capacité à fournir des solutions optimales pour les réponses du DPPH (CI_{50}) et du pouvoir réducteur (CE_{50}) séparément, la fonction de désirabilité permet également de déterminer les conditions optimales pour les deux réponses étudiées simultanément.

Dans notre étude, l'optimisation simultanée vise à déterminer le meilleur compromis pour améliorer ces deux réponses. D'après le graphique de désirabilité (figure 37), l'optimisation des deux réponses examinées est possible avec une désirabilité d'environ 99,33 % en assurant un mélange ternaire avec les proportions suivantes : 51 % de l'HE d'*E. polybractea*, 32 % l'HE d'*O. mixta* et 17 % de l'HE de *L. burnatii*. Les valeurs de réponse optimales correspondantes à cette formulation sont égales à 0,089 mg/ml pour la CI_{50} du DPPH et 0,190 mg/ml pour la CE_{50} du pouvoir réducteur.

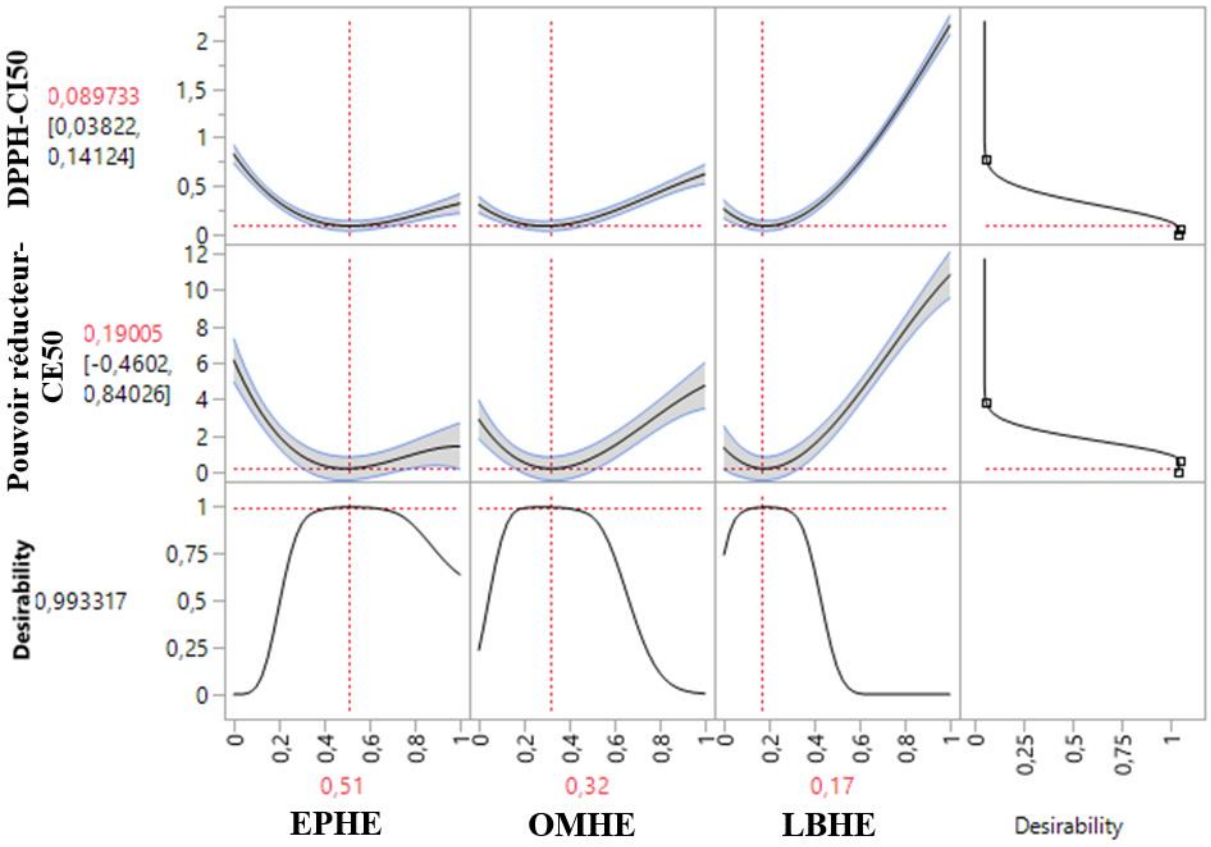


Figure 37. Profil de désirabilité de l'optimisation simultanée montrant les proportions précises des trois HEs testées, conduisant à des valeurs optimales pour les deux réponses (CI_{50} du DPPH et CE_{50} du pouvoir réducteur).

5. Validation expérimentale des conditions optimales

La précision des modèles cubiques spéciaux générés pour les deux réponses, (CI_{50} du DPPH et CE_{50} du pouvoir réducteur), a été vérifiée par un test de validation (point test). Ce test consiste à comparer les résultats prédits par ce point avec ceux obtenus expérimentalement. Les coordonnées des points de test choisis étaient les proportions des constituants du mélange, obtenues grâce à l'optimisation simultanée des deux réponses (figure 37). Le tableau 41 montre que les valeurs expérimentales obtenues sont en accord avec celles prédites, et aucune différence significative n'a été observée entre les réponses expérimentales et estimées. Par conséquent, nous avons considéré que le choix des modèles postulés était approprié.

Tableau 41. Valeurs prédites et expérimentales pour le point de test réalisé par les mélanges optimaux trouvés.

Composés des mélanges	Proportions des HEs (%)	CI_{50}-DPPH (mg/ml)		CE_{50}-Pouvoir réducteur (mg/ml)	
		Valeurs prédite [a]	Valeur expérimentale [b]	Valeur prédite [a]	Valeur expérimentale [b]
E. polybractea	51	0,0897 ± 0,007	0,0912± 0,021	0,1900 ± 0,016	0,231± 0,032
O. mixta	32				
L. burnatii	17				

[a] La valeur prédite est donnée avec l'écart-type de la réponse calculée à partir du modèle.

[b] La valeur observée est la moyenne de trois répétitions (n=3) avec ± l'écart-type.

6. Discussion

Les HEs, avec leurs propriétés antioxydantes, suscitent un intérêt tant chez les fabricants de produits alimentaires que chez les consommateurs. Avec les préoccupations croissantes concernant la sécurité des substances synthétiques utilisées dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, les scientifiques explorent désormais activement des sources alternatives naturelles d'antioxydants. Dans ce contexte, les HEs peuvent être envisagées comme des additifs plus sûrs pour les produits alimentaires. En outre, la combinaison des HEs peut offrir une capacité antioxydante plus puissante que celle d'une huile individuelle, sans compromettre le potentiel antioxydant global du mélange.

Cela peut être lié à une diversité biologique accrue d'un mélange. Il est donc utile d'évaluer l'activité antioxydante des HEs individuellement et en combinaison, en utilisant une méthodologie de conception de mélange centré augmenté. Dans notre étude, les résultats montrent que la capacité antioxydante des mélanges combinés est plus élevé que celle des HEs individuelles dans les deux tests *in vitro* utilisés. En effet, cette activité peut être attribuée à la présence de phénols monoterpéniques (le carvacrol), des hydrocarbures monoterpéniques (le terpinolène, le *p*-cymène, et le limonène), et des monoterpènes oxygénés tels que le 1,8-cinéole, le linalool et le camphre dans les trois HEs testées (Aazza et al., 2011; De Groot and Schmidt, 2016; Ruberto and Baratta, 2000). Ces composants volatiles pourraient agir seuls ou en synergie en tant qu'agents antioxydants naturels.

Les composés phénoliques et /ou monoterpéniques, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'oxygène singulier ($^1O_2$) et d'hydrogène (Graßmann, 2005; Rice-evans et al., 1995; Tepe et al., 2005). De plus, en raison de leur réactivité accrue contre les radicaux peroxyle, facilitant ainsi leur élimination par le transfert formel de l'atome d'hydrogène (Amorati et al., 2013; Foti, 2007). En effet, une étude réalisée par Ruberto et Baratta (2000), visant à évaluer l'activité antioxydante de 100 constituants purs des HEs, a souligné que les composés polyphénoliques, particulièrement le carvacrol et le thymol, ont montré l'activité antioxydante la plus élevée. En outre, d'autres auteurs ont révélé que la teneur en monoterpènes des HEs peut agir comme agents piégeurs de radicaux libres, mais il semble que les HEs contenant des hydrocarbures monoterpéniques et/ou des sesquiterpènes, ainsi que des monoterpènes oxygénés, possèdent un pouvoir antioxydant remarquables (Burits et al., 2001; Graßmann, 2005; Mau et al., 2003; Ruberto and Baratta, 2000; Tepe et al., 2004).

De nombreux chercheurs ont évalué et optimisé l'activité antioxydante des mélanges ternaires à l'aide de diverses méthodes (Bag and Chattopadhyay, 2015; Baj et al., 2023; Crespo et al., 2019; El Baakili et al., 2023; Nouioura et al., 2023; Prakash et al., 2015). Baj et al., (2023) ont examiné l'effet antioxydant de mélanges des HEs d'*Ocimum basilicum* L., *Juniperus virginiana* L., *Cymbopogon nardus* L., et *Thymus vulgaris* L., en utilisant le test du DPPH. Les résultats ont montré un effet antioxydant significatif, avec une valeur de CI_{50} de 0,65 mg/ml. Dans ce contexte, les combinaisons binaires des HEs de *Coriandrum sativum, Brassica nigra*, et *Cuminum cyminum* ont montré des interactions additives et /ou synergiques contre les radicaux libres du DPPH (Bag and Chattopadhyay, 2015). En outre, Nouioura et ses collaborateurs (2023) ont adopté la méthodologie des plans de mélanges pour étudier les interactions potentielles entre les extraits d'*Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L., et *Petroselinum crispum* (Mill.). En effet, un pouvoir antioxydant notable a été obtenu, avec un pourcentage d'inhibition atteignant 56,21 %. De même, la combinaison de l'HE d'*Angelica archangelica* L., l'alcool phényléthylique et de l'α-terpinéol a révélé un effet synergique important, avec une CI_{50} de 3,89 µl/ml (Prakash et al., 2015). Ces interactions sont principalement attribuées au profil phytochimique de chaque HE. Différents mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer ce phénomène. En effet, l'interaction entre le thymol et le carvacrol a démontré un effet antioxydant synergique (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015).

Les terpénoïdes ayant une structure cyclohexadiène, tels que le γ-terpinène, et l'α-phellandrène, agissent comme antioxydants grâce à leur capacité d'autoxydation (Amorati et al., 2013). Ces composés ont également montré une activité synergique lorsqu'ils sont combinés avec des composés polyphénoliques tels que la rutine (Milde et al., 2004). De plus, le monoterpène hydrocarboné *p*-cymène est connu pour son activité antioxydante substantielle. Par ailleurs, cette molécule a démontré une activité antioxydante synergique avec le carvacrol et/ou le thymol, cependant elle a présenté une action antagoniste avec la thymoquinone (Milos and Makota, 2012). Des recherches antérieures ont également contribué à expliquer les interactions synergiques entre les HEs. En effet, Ariga et al., (1988) ont signalé que les doubles liaisons carbone/carbone insaturées (C = C) peuvent inhiber les réactions radicalaires en captant les électrons célibataires à partir de radicaux libres pour former un système de nuage d'électrons stable. En revanche, Senanayake (2013) a rapporté l'existence de deux catégories d'antioxydants, distinguées par leur mécanisme d'action, à savoir les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires ou préventifs. Les antioxydants primaires perturbent la réaction en chaîne oxydante des radicaux libres en donnant des atomes d'hydrogène ou des électrons issus des groupes hydroxyles phénoliques et par la suite, stabilisent les radicaux libres lipidiques, ralentissent ou inhibent le stade d'initiation, et perturbent la phase de propagation de l'autoxydation. Cependant, les antioxydants secondaires désactivent l'oxygène singulet ($^1O_2$), chélatent les ions métalliques tels que le cuivre et le fer, absorbent les rayons ultraviolets, piègent l'oxygène et contribuent à la régénération des antioxydants primaires. Ils définissent la synergie antioxydante comme la combinaison des antioxydants primaires avec ceux secondaires (Amorati et al., 2013).

De manière générale, les HEs possèdent une grande diversité de constituants chimiques dépendant de nombreux facteurs externes, qui peuvent affecter leurs interactions mutuelles (Baj et al., 2023). Par conséquent, afin d'optimiser leurs effets biologiques mutuels, une modélisation statistique doit être envisagée. Le plan de mélange est considéré comme un outil approprié pour générer des combinaisons dotées des propriétés optimales, pouvant ainsi être utilisées en tant qu'alternatives naturelles aux antioxydants synthétiques conventionnels dans les secteurs alimentaire et /ou pharmaceutique. Cependant, des études supplémentaires sur les aspects pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, ainsi que sur le profil toxicologique des formulations optimales développées, sont nécessaires pour garantir leur sécurité.

Conclusion et Perspectives

Grâce à sa situation géographique, le Maroc possède une grande diversité climatique et d'importantes ressources hydriques, ce qui en fait un pays riche en flore, notamment les plantes médicinales et aromatiques dotées de propriétés thérapeutiques variées. Les plantes médicinales restent une source inestimable de principes actifs reconnus par leurs propriétés thérapeutiques, notamment les HEs, utilisées à des fins cosmétiques, pharmaceutiques, alimentaires et médicinales.

Les recherches sur les propriétés biologiques des plantes aromatiques et médicinales au Maroc ont reconnu une progression remarquable. Ceci montre que les HEs obtenues à partir de ces plantes sont très intéressantes, que ce soit pour leur usage comme remèdes alternatifs ou pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

L'objectif principal de cette étude est d'approfondir les compréhensions relatives aux HEs de quatre plantes médicinales et aromatiques, à savoir *Eucalyptus polybractea, Ormenis mixta, Lavandula burnatii* et *Lavandula angustifolia*, en vue de découvrir de nouvelles molécules naturelles bioactives qui pourraient être utilisées pour :

- Lutter contre l'émergence de souches microbiennes multirésistantes ;
- Élaborer des combinaisons pour éliminer les biofilms adhérant à la surface de la résine acrylique ;
- Servir en tant qu'alternatives naturelles aux antioxydants synthétiques, qui s'avèrent de plus en plus nuisibles pour la santé humaine.

Dans cette investigation, nous avons évalué la composition phytochimique ainsi que les activités antimicrobiennes, antioxydantes et antibiofilms de quatre HEs extraites de plantes provenant du Nord du Maroc. De plus, nous avons réalisé une étude sur l'activité antimicrobienne, antibiofilm et antioxydante des combinaisons ternaires des huiles d'*E. polybractea, L. burnatii* et *O. mixta* en utilisant un plan d'expérience.

L'analyse de la composition phytochimique des quatre huiles extraites par hydrodistillation, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), révèle une composition variée et complexe, comprenant de nombreuses dizaines de molécules, avec des concentrations notables en monoterpènes (1,8-cinéole, p-cymène, linalol, acétate de linalyle, camphre et α-pinène) dans la composition chimique de chaque HE.

L'étude de l'activité antimicrobienne à l'aide des méthodes de diffusion sur disque ainsi que de microdilution a révélé que les quatre huiles testées exerçaient un pouvoir bactéricide et fongicide contre les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif et *Candida albicans.* En effet, une sensibilité Gram-dépendant a été aussi remarquée. En outre, l'activité antimicrobienne des mélanges binaires, mise en évidence par le calcul de l'ICIF contre *E. coli, S. aureus* et *C. albicans*, a montré des résultats antimicrobiens synergiques, indifférents ou additifs. De plus, l'effet antimicrobien combiné des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii* a été confirmé en utilisant un plan de mélange. Il convient de souligner que les combinaisons optimales des huiles ont montré des résultats supérieurs à ceux atteints avec des HEs pures.

Ensuite, l'activité antiadhésive des HEs pures d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, ainsi que de leurs mélanges optimaux (les combinaisons qui ont démontré la meilleure efficacité), a été évaluée vis-à-vis de la formation de biofilm d'*E. coli* (32 % de l'HE d'*E. polybractea*, 28% de l'HE d'*O. mixta* et 40 % de l'HE de *L. burnatii*) et de *S. aureus* (35 % de l'HE d'*E. polybractea*, 30 % de l'HE d'*O. mixta* et 35 % de l'HE de *L. burnatii*) à la surface de la résine acrylique. Les résultats ont révélé que les combinaisons optimales étaient plus performantes contre la formation de biofilms des deux cellules bactériennes que les HEs pures. L'empêchement de l'adhésion des souches bactériennes peut être attribuée au fait que le traitement avec les huiles, notamment les combinaisons, a modifié les caractéristiques physicochimiques de la surface de la résine acrylique. De plus, l'activité anti-biofilm importante des formulations optimales contre l'adhésion bactérienne peut s'expliquer par les interactions synergiques entre ces trois huiles.

Par ailleurs, le pouvoir antioxydant des HEs pures d'*E. polybractea*, *O. mixta*, *L. burnatii* et de *L. angustifolia* a été évalué en utilisant deux méthodes complémentaires, à savoir les tests DPPH et pouvoir réducteur. Les résultats ont révélé que les HEs testées présentent des activités antioxydantes, avec des degrés variables de pouvoir réducteur du fer et d'activité anti-radicalaire (DPPH).

Enfin, l'activité antioxydante des mélanges ternaires des HEs d'*E. polybractea*, *O. mixta* et *L. burnatii*, a été étudié à l'aide d'un plan de mélange. L'optimisation de la capacité antioxydante des combinaisons a montré l'effet synergique entre les trois huiles. Généralement, le mélange des huiles a montré de meilleurs résultats que ceux atteints avec des HEs seules. Ainsi, l'utilisation d'un modèle de conception de mélange s'est révélée efficace.

L’ensemble des conclusions obtenues lors de cette investigation pourrait former une justification scientifique de l'usage traditionnel d’*E. polybractea, O. mixta, L. burnatii* et *L. angustifolia*, ainsi qu'une preuve de leur efficacité thérapeutique contre diverses pathologies.

À la suite de ces travaux, de nombreuses voies de recherche s'ouvrent, en particulier concernant le mode d'action antibactérien des huiles, ainsi que leur utilisation potentielle dans différents secteurs, notamment dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique comme agents antimicrobiens, anti-inflammatoires et antioxydants. Il serait donc intéressant d'envisager les activités suivantes :

- Évaluer l'activité antimicrobienne des HEs et des formulations développées contre d’autres bactéries et champignons, en ciblant d’autres mécanismes d’action ;
- Évaluer les effets antimicrobiens et antioxydants combinés des composés majoritaires des HEs mélangées ;
- Analyser la composition chimique des formulations optimales ayant des activités antioxydantes et antimicrobiennes ;
- Expérimenter la combinaison des HEs avec des additifs chimiques ;
- Étudier les propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des HEs étudiées afin de confirmer leur efficacité et leur innocuité ;
- Effectuer une étude approfondie sur le mode d'action des huiles testées afin d’obtenir une compréhension plus précise et détaillée ;
- Prolonger cette investigation en effectuant des essais *in vivo* des HEs examinées, afin de confirmer les effets biologiques qu'elles ont révélés, d'identifier les principes actifs responsables de ces activités biologiques et d'élucider leurs mécanismes d'action ;
- Élaborer un produit fini à partir des combinaisons identifiées.

Références Bibliographiques

Aafi, A., Achhal, A.K., Benabid, A., Rouchdi, M., 2005. Richesse et diversité floristique de l'écosystème de chêne-liège de la forêt de la Mamora. Acta Botanica Malacitana 30, 127–138.

Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. Molecules 16, 7672–7690.

Abdallah, E.M., 2016. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Acute Disease 5, 512–516.

Abdel-Baki, A.-A.S., Aboelhadid, S.M., Al-Quraishy, S., Hassan, A.O., Daferera, D., Sokmen, A., Kamel, A.A., 2023. Cytotoxic, Scolicidal, and Insecticidal Activities of *Lavandula stoechas* Essential Oil. Separations 10, 100.

Abdelkader, H., Nadia, K., Salima, B., 2016. Chemical composition and antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* L. essential oil from Oran (Algeria). Advances in Bioscience and Biotechnology 7, 539–544.

Abdellatif, A.A., Alhathloul, S.S., Aljohani, A.S., Maswadeh, H., Abdallah, E.M., Hamid Musa, K., El Hamd, M.A., 2022. Green synthesis of silver nanoparticles incorporated aromatherapies utilized for their antioxidant and antimicrobial activities against some clinical bacterial isolates. Bioinorganic Chemistry and Applications 2022.

Abebe, G.M., 2020. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. International journal of microbiology 2020.

Abedini, A., 2013. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit.(Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Université du Droit et de la Santé-Lille II.

Aboalhaija, N.H., Syaj, H., Afifi, F., Sunoqrot, S., Al-Shalabi, E., Talib, W., 2022. Chemical Evaluation, *In Vitro* and *In Vivo* Anticancer Activity of *Lavandula angustifolia* Grown in Jordan. Molecules 27, 5910.

Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M., Lyoussi, B., 2022. Simultaneous optimization of extraction yield, phenolic compounds and antioxidant activity of Moroccan propolis extracts: Improvement of ultrasound-assisted technique using response surface methodology. Processes 10, 297.

Achinas, S., Charalampogiannis, N., Euverink, G.J.W., 2019. A brief recap of microbial adhesion and biofilms. Applied sciences 9, 2801.

Adams, R.P., 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing.

Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured publishing corporation.

Adrar, N., Oukil, N., Bedjou, F., 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. Industrial Crops and Products 88, 112–119.

Afnor, 2000. Huiles Essentielles. Afnor, Paris La Défense, France.

Aichaoui, S., Hanane, A., 2018. Etude phytochimique et activité biologique des extraits de l'espèce *Lavandula angustifolia* Mill. Dans la région Est d'Algérie (Batna). Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila.

Akhtar, M., Ahmad, R., Qureshi, T.M., Iqbal, Z., Akhter, J., 2011. Variation in composition and yield of foliage oil of *Eucalyptus polybractea*. Journal of the Chemical Society of Pakistan 33, 183.

Akram, R., Iqbal, R., Hussain, R., Jabeen, F., Ali, M., 2021. Evaluation of Oxidative stress, antioxidant enzymes and genotoxic potential of bisphenol A in fresh water bighead carp (*Aristichthys nobils*) fish at low concentrations. Environmental Pollution 268, 115896.

https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115896
Akthar, M.S., Degaga, B., Azam, T., 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. J. Issues ISSN 2350, 1588.
Al-Ansari, M.M., Andeejani, A.M., Alnahmi, E., AlMalki, R.H., Masood, A., Vijayaraghavan, P., Rahman, A.A., Choi, K.C., 2021. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Lavandula latifolia* L. and its deterrent effects on *Euphoria leucographa*. Industrial Crops and Products 170, 113740.
Aldoghaim, F., Flematti, G., Hammer, K., 2018. Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian Eucalyptus Essential Oils. Microorganisms 6, 122. https://doi.org/10.3390/microorganisms6040122
Ali, I.B.E.H., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., Harzallah-Skhiri, F., 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. Industrial crops and products 77, 631–639.
Alibi, S., Selma, W.B., Ramos-Vivas, J., Smach, M.A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., Mansour, H.B., 2020. Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. Current Research in Translational Medicine 68, 59–66.
Al-Mijalli, S.H., Assaggaf, H., Qasem, A., El-Shemi, A.G., Abdallah, E.M., Mrabti, H.N., Bouyahya, A., 2022. Antioxidant, antidiabetic, and antibacterial potentials and chemical composition of *Salvia officinalis* and *mentha suaveolens* grown wild in Morocco. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences 2022.
Al-Mijalli, S.H., El Hachlafi, N., Abdallah, E.M., Jeddi, M., Assaggaf, H., Qasem, A., Alnasser, S.M., Attar, A., Naem, M.A., Lee, L.-H., 2023a. Exploring the antibacterial mechanisms of chemically characterized essential oils from leaves and buds of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Industrial Crops and Products 205, 117561.
Al-Mijalli, S.H., Jeddi, M., El Hachlafi, N., Abdallah, E.M., Assaggaf, H., Qasem, A., Rajab, B.S., Lee, L.-H., Bouyahya, A., Goh, K.W., 2023b. Combination of sweet orange, lentisk and lemon eucalyptus essential oils: Optimization of a new complete antimicrobial formulation using a mixture design methodology. Heliyon 9.
Álvarez-Martínez, F.J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Micol, V., 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. Phytomedicine 90, 153626.
Amina, L., 2020. Effet de la variabilité génétique sur le mode de régénération et le comportement des jeunes plants chez le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf. subsp. atlantica).
Ammann, A., Hinz, D.C., Addleman, R.S., Wai, C.M., Wenclawiak, B.W., 1999. Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil. Fresenius' journal of analytical chemistry 364, 650–653.
Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L., 2013. Antioxidant activity of essential oils. Journal of agricultural and food chemistry 61, 10835–10847.
Anass, E., El Amrani, A., Eddine, J.J., 2015. Effect of the parts of plant material (flowers and leaves) on essential oil chemical composition of *Ormenis mixta* from Morocco. Journal of Essential Oil Bearing Plants 18, 398–408.

Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C.A., Quek, S.Y., 2022. Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. Foods 11, 464.

Aouan, B., Alehyen, S., Fadil, M., El Alouani, M., Saufi, H., El Makhoukhi, F., Taibi, M., 2023a. Development and optimization of geopolymer adsorbent for water treatment: Application of mixture design approach. Journal of Environmental Management 338, 117853.

Aouan, B., Alehyen, S., Fadil, M., El Alouani, M., Saufi, H., Taibi, M., 2023b. Characteristics, microstructures, and optimization of the geopolymer paste based on three aluminosilicate materials using a mixture design methodology. Construction and Building Materials 384, 131475.

APG, I., 2009. Classification phylogénétique, version 04, l'Angiosperms Phylogeny Group. Elle est une modification de la classification phylogénétique APG III.

Ariga, T., Koshiyama, I., Fukushima, D., 1988. Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans in aqueous systems. Agricultural and biological chemistry 52, 2717–2722.

Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American oil chemists' society 75, 199–212.

Asensio, C.M., Paredes, A.J., Martin, M.P., Allemandi, D.A., Nepote, V., Grosso, N.R., 2017. Antioxidant stability study of oregano essential oil microcapsules prepared by spray-drying. Journal of food science 82, 2864–2872.

Ashrafudoulla, M., Mizan, M.F.R., Park, S.H., Ha, S.-D., 2021. Antibiofilm activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on MBEC^{TM} biofilm device and polypropylene surface. LWT 147, 111575.

Assaggaf, H.M., Naceiri Mrabti, H., Rajab, B.S., Attar, A.A., Hamed, M., Sheikh, R.A., Omari, N.E., Menyiy, N.E., Belmehdi, O., Mahmud, S., 2022. Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of *Eucalyptus globulus* on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: In Vitro and In Vivo Findings. Molecules 27, 5121.

Bachiri, L., Labazi, N., Daoudi, A., Ibijbijien, J., Nassiri, L., Echchegadda, G., Mokhtari, F., 2015. Etude ethnobotanique de quelques lavandes marocaines spontanées. International Journal of Biological and Chemical Sciences 9, 1308–1318.

Bag, A., Chattopadhyay, R.R., 2015. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. PloS one 10, e0131321.

Baj, T., Baryluk, A., Sieniawska, E., 2018. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Industrial Crops and Products 115, 52–61.

Baj, T., Kowalska, G., Kowalski, R., Szymańska, J., Kai, G., Coutinho, H.D.M., Sieniawska, E., 2023. Synergistic Antioxidant Activity of Four—Component Mixture of Essential Oils: Basil, Cedarwood, Citronella and Thyme for the Use as Medicinal and Food Ingredient. Antioxidants 12, 577.

Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A.G., Maggi, F., 2017. Chemical composition and antibacterial activity of Iranian *Lavandula× hybrida*. Chemistry & biodiversity 14, e1700064.

Bajpai, V.K., Sharma, A., Baek, K.-H., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. Food control 32, 582–590.

Bajpai, V.K., Shukla, S., Kang, S.C., 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. Bioresource technology 99, 8903–8908.

Baker, J., Brown, K., Rajendiran, E., Yip, A., DeCoffe, D., Dai, C., Molcan, E., Chittick, S.A., Ghosh, S., Mahmoud, S., 2012. Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology 46, 446–475.

Balahbib, A., El Omari, N., Hachlafi, N.E., Lakhdar, F., El Menyiy, N., Salhi, N., Mrabti, H.N., Bakrim, S., Zengin, G., Bouyahya, A., 2021. Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. Food and Chemical Toxicology 153, 112259.

Barbosa, L.N., Alves, F.C.B., Andrade, B.F.M.T., Albano, M., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H., Buzalaf, M.A.R., de Lima Leite, A., de Pontes, L.G., Dos Santos, L.D., 2020. Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella enteritidis* submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. Journal of proteomics 214, 103625.

Bardaweel, S., Hudaib, M., Tawaha, K., 2014. Evaluation of antibacterial, antifungal, and anticancer activities of essential oils from six species of *Eucalyptus*. Journal of Essential Oil Bearing Plants 17, 1165–1174.

Basri, D.F., Luoi, C.K., Azmi, A.M., Latip, J., 2012. Evaluation of the combined effects of stilbenoid from Shorea gibbosa and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Pharmaceuticals 5, 1032–1043.

Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 17, 3989–4006.

Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H., 2010. 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 15, 7825–7839.

Baydar, H., Kineci, S., 2009. Scent composition of essential oil, concrete, absolute and hydrosol from lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). Journal of Essential Oil Bearing Plants 12, 131–136.

Bejar, E., 2020. Adulteration of English Lavender *(Lavandula angustifolia*) essential oil. Botanical Adulterants Prevention Bulletin 1, 543–80.

Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médicine arabe ancienne et savoirs populaires.

Benabid, A., 2000. Flore et écosystèmes du Maroc: Evaluation et préservation de la biodiversité.

Benkhaira, N., Ech-Chibani, N., Fikri-Benbrahim, K., 2021. Ethnobotanical survey on the medicinal usage of two common medicinal plants in Taounate Region: *Artemisia herba-alba* Asso and *Ormenis mixta* (L.) Dumort. Ethnobotany Research and Applications 22, 1–19.

Benkhaira, N., Koraichi, S.I., Fikri-Benbrahim, K., 2022. In vitro methods to study antioxidant and some biological activities of essential oils: a review. Biointerface Res. Appl. Chem 12, 3332.

Benkhaira, N., Zouine, N., Fadil, M., Ibnsouda Koraichi, S., El Hachlafi, N., Jeddi, M., Lachkar, M., Fikri-Benbrahim, K., 2023. Application of mixture design for the optimum antibacterial action of chemically-analyzed essential oils and investigation of the antiadhesion ability of their optimal mixtures on 3D printing material. Bioprinting e00299. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00299

Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi, A., Zidane, L., 2014. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya). Journal of applied biosciences 78, 6771–6787.

Bergman, M.E., Davis, B., Phillips, M.A., 2019. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. Molecules 24, 3961. https://doi.org/10.3390/molecules24213961

Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D., 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. Grain & oil science and technology 2, 49–55.

Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C., 2014. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. Evidence-based complementary and alternative medicine 2014.

Blažeković, B., Yang, W., Wang, Y., Li, C., Kindl, M., Pepeljnjak, S., Vladimir-Knežević, S., 2018. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula* × *intermedia* 'Budrovka' and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. Industrial Crops and Products 123, 173–182. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.041

Boren, K., Crown, A., Carlson, R., 2020. Multidrug and pan-antibiotic resistance—the role of antimicrobial and synergistic essential oils: a review. Natural Product Communications 15, 1934578X20962595.

Botineau, M., 2010. Systematic and applied botany of flowering plants. Systematic and applied botany of flowering plants.

Botineau, Michel, 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., 1990. Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. Masson Paris.

Bottone, E.J., 2010. Bacillus cereus, a volatile human pathogen. Clinical microbiology reviews 23, 382–398.

Bouhdid, S., Abrini, J., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. Journal of applied microbiology 106, 1558–1568.

Boullard, B., 2001. Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. De Boeck Secundair.

Boulouaret, W., Boufroua, R., 2021. Etude chimique et biologique des huiles essentielles et des métabolites secondaire de deux plaantes médicinales: *Myrtus communis* l. et *Mentha pulegium* l. Université jijel.

Bouratoua, A., Ferhat, M., Kabouche, A., Laggoune, S., Touzani, R., Kabouche, Z., 2014. Comparative compositions of essential oils of Ferula. J. Mater. Environ. Sci 5, 1214–1217.

Bouyahya, A., Chamkhi, I., Guaouguaou, F.-E., Benali, T., Balahbib, A., El Omari, N., Taha, D., El-Shazly, M., El Menyiy, N., 2020. Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. Journal of ethnopharmacology 259, 112925.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Fellah, H., Bakri, Y., Dakka, N., 2017a. *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 12, 179–184.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaui, A., Fellah, H., Abrini, J., Dakka, N., 2017b. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microbial pathogenesis 111, 41–49.

Box, G.E., Hunter, W.H., Hunter, S., 1978. Statistics for experimenters. John Wiley and sons New York.

Brahim, M.A.S., Fadli, M., Hassani, L., Boulay, B., Markouk, M., Bekkouche, K., Abbad, A., Ali, M.A., Larhsini, M., 2015. *Chenopodium ambrosioides* var. ambrosioides used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. Industrial Crops and products 71, 37–43.

Bräuchler, C., Meimberg, H., Heubl, G., 2010. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)–taxonomy, biogeography and conflicts. Molecular phylogenetics and evolution 55, 501–523.

Bremer, K., Anderberg, A.A., 1994. Asteraceae: cladistics and classification. (No Title).

Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naitali, M., Briandet, R., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. Food microbiology 45, 167–178.

Brooker, M.I.H., 2000. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her.(Myrtaceae). Australian systematic botany 13, 79–148.

Buckley, K., Grotticelli, J., 2022. *Bacillus cereus*.

Burits, Mazra, Asres, K., Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytotherapy Research 15, 103–108.

Burits, M., Asres, K., Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra* , *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytotherapy Research 15, 103–108. https://doi.org/10.1002/ptr.691

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology 94, 223–253.

Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Tubau, F., Macia, M.D., Rodríguez, C., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Pena, C., Martínez-Martínez, L., 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginos*a isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 1906–1911.

Candioti, L.V., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C., 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. Talanta 124, 123–138.

Caprari, C., Fantasma, F., Monaco, P., Divino, F., Iorizzi, M., Ranalli, G., Fasano, F., Saviano, G., 2023. Chemical Profiles, In Vitro Antioxidant and Antifungal Activity of Four Different *Lavandula angustifolia* L. EOs. Molecules 28, 392.

Caputo, L., Souza, L.F., Alloisio, S., Cornara, L., De Feo, V., 2016. *Coriandrum sativum* and *Lavandula angustifolia* essential oils: Chemical composition and activity on central nervous system. International journal of molecular sciences 17, 1999.

Caraher, E., Reynolds, G., Murphy, P., McClean, S., Callaghan, M., 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. European journal of clinical microbiology & infectious diseases 26, 213–216.

Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J., 2016. Lavandin (*Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loiseleur) essential oil from Spain: determination of aromatic profile by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. Natural Product Research 30, 1123–1130. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1043632

Cecerska-Heryć, E., Surowska, O., Heryć, R., Serwin, N., Napiontek-Balińska, S., Dołęgowska, B., 2021. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients – A review. Clinical Biochemistry 93, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.03.008

Celiktas, O.Y., Kocabas, E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry 100, 553–559.

Chatterjee, S., 2016. Oxidative stress, inflammation, and disease, in: Oxidative Stress and Biomaterials. Elsevier, pp. 35–58.

Chebbac, K., Ghneim, H.K., El Moussaoui, A., Bourhia, M., El Barnossi, A., Benziane Ouaritini, Z., Salamatullah, A.M., Alzahrani, A., Aboul-Soud, M.A., Giesy, J.P., 2022. Antioxidant and antimicrobial activities of chemically-characterized essential oil from *Artemisia aragonensis* Lam. against drug-resistant microbes. Molecules 27, 1136.

Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J.D., Jiang, S., 2007. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. Biomaterials 28, 4192–4199.

Chibi, A., Hassaine, A., 2023. Essential Oil of *Eucalyptus polybractea* (L.): Chemical Composition, Antifungal, Insect Repellent and Insecticidal Activities. Tropical Journal of Natural Product Research 7, 4160–4165.

Cho, T.J., Park, S.M., Yu, H., Seo, G.H., Kim, H.W., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2020. Recent advances in the application of antibacterial complexes using essential oils. Molecules 25, 1752.

Chraibi, M., Fadil, M., Farah, A., Benkhaira, N., Lebrazi, S., Fikri-Benbrahim, K., 2023. Simplex-centroid design as innovative approach in the optimization of antimicrobial effect of *Thymus satureioides, Myrtus communis* and *Artemisia herba alba* essential oils against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ***and*** *Candida tropicalis*. Experimental Parasitology 247, 108472.

Chraibi, M., Fadil, M., Farah, A., Lebrazi, S., Fikri-Benbrahim, K., 2021. Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium, Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus, E. coli* and C. tropicalis: Application of mixture design methodology. LWT 145, 111352.

Chu, W.-S., Magee, B.B., Magee, P.T., 1993. Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. Journal of bacteriology 175, 6637–6651.

Clevenger, J.F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912) 17, 345–349.

CLSI, C. and L.S.I., 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition. Pennsylvania 19087 USA.

Coma, V., 2012. Antimicrobial and antioxidant active packaging for meat and poultry, in: Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging. Elsevier, pp. 477–503.

Costa, M.F., Durço, A.O., Rabelo, T.K., Barreto, R. de S.S., Guimarães, A.G., 2019. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. Journal of pharmacy and pharmacology 71, 141–155.

Craft, K.M., Nguyen, J.M., Berg, L.J., Townsend, S.D., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. MedChemComm 10, 1231–1241.

Crespo, Y.A., Sánchez, L.R.B., Quintana, Y.G., Cabrera, A.S.T., Del Sol, A.B., Mayancha, D.M.G., 2019. Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L. and *Coriandrum sativum* L. using simplex-lattice design. Heliyon 5.

da Silva, B.D., Bernardes, P.C., Pinheiro, P.F., Fantuzzi, E., Roberto, C.D., 2021. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. Meat Science 176, 108463.

Daget, P., 1977. Le bioclimat méditerranéen: caractères généraux, modes de caractérisation. Vegetatio 34, 1–20.

Danh, L.T., Han, L.N., Triet, N.D.A., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N., 2013. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO 2, hexane and hydrodistillation. Food and bioprocess technology 6, 3481–3489.

Darriet, F., Bendahou, M., Costa, J., Muselli, A., 2012. Chemical compositions of the essential oils of the aerial parts of *Chamaemelum mixtum* (L.) Alloni. Journal of agricultural and food chemistry 60, 1494–1502.

Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Frontiers in environmental science 2, 53.

Davis, G.R., 2002. Cultivation and production of *eucalyptus* in Australia. Taylor and Francis: London and New York.

Davis, J.L., 2018. Pharmacologic principles. Equine internal medicine 4, 79–137.

De Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., De Oliveira, M.E.G., De Souza, E.L., 2011a. 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 44, 1541–1548.

De Groot, A.C., Schmidt, E., 2016. Essential oils, part III: chemical composition. Dermatitis 27, 161–169.

de Kraker, M.E., Stewardson, A.J., Harbarth, S., 2016. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? PLoS medicine 13, e1002184.

De Martino, L., De Feo, V., Nazzaro, F., 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. Molecules 14, 4213–4230.

Déciga-Campos, M., Beltrán-Villalobos, K.L., Aguilar-Mariscal, H., González-Trujano, M.E., Ángeles-López, G.E., Ventura-Martínez, R., 2021. Synergistic herb-herb interaction of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Syzygium aromaticum* and *Rosmarinus officinalis* combination. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2021.

Dejouhanet, L., Pinton, F., 2023. Les producteurs-cueilleurs de plantes aromatiques et médicinales (PAM) en France hexagonale et en Guyane: convergences, singularités et enjeux. Développement durable et territoires. Économie, géographie, politique, droit, sociologie 14.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and *eucalyptus* essential oils. International journal of food microbiology 74, 101–109.

Deng, M., Dong, L., Jia, X., Huang, F., Chi, J., Muhammad, Z., Ma, Q., Zhao, D., Zhang, M., Zhang, R., 2022. The flavonoid profiles in the pulp of different pomelo (Citrus grandis L. Osbeck) and grapefruit (*Citrus paradisi* Mcfad) cultivars and their in vitro bioactivity. Food chemistry: X 15, 100368.

Détár, E., Németh, É.Z., Gosztola, B., Demján, I., Pluhár, Z., 2020. Effects of variety and growth year on the essential oil properties of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). Biochemical Systematics and Ecology 90, 104020.

Devanga Ragupathi, N.K., Veeraraghavan, B., Karunakaran, E., Monk, P.N., 2022. Biofilm-mediated nosocomial infections and its association with antimicrobial resistance: Detection, prevention, and management. Frontiers in Medicine 9, 987011.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W., 2016a. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines 3, 25.

Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P., 2012. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and S. aureus during storage at abuse refrigeration temperature. Meat Science 92, 667–674. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.019

Djibo, A.K., 2000. Analyses des huiles essentielles de quelque plantes de la flore du Burkina Faso appartenant aux familles des Lamiaceae et des Poaceae. Thèse de doctorat. Université d'Ouagadougou.

Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y., 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. Journal of animal science and biotechnology 6, 1–12.

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.-É., Tristan, A., Vandenesch, F., 2010. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*-Les points-clés en 2010. médecine/sciences 26, 943–949.

Ebrahimi, M., Khosravi-Darani, K., 2013. Essential oils as natural food preservatives: antimicrobial and antioxidant applications. Antimicrobials from nature: effective control agents for drug resistant pathogens.

El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F., Aberchane, M., 2008. Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. Base.

El Baakili, A., Fadil, M., Es-Safi, N.E., 2023. Ultrasonic-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant activity of Moroccan Retama sphaerocarpa L. leaves: Simultaneous optimization by response surface methodology and characterization by HPLC/ESI-MS analysis. Heliyon.

El Hachlafi, N., Benkhaira, N., Al-Mijalli, S.H., Mrabti, H.N., Abdnim, R., Abdallah, E.M., Jeddi, M., Bnouham, M., Lee, L.-H., Ardianto, C., 2023a. Phytochemical analysis and evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antidiabetic activities of essential oils from Moroccan medicinal plants: *Mentha suaveolens*, *Lavandula stoechas*, and *Ammi visnaga*. Biomedicine & Pharmacotherapy 164, 114937.

El Hachlafi, N., Chebat, A., Fikri-Benbrahim, K., 2021. Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Properties of *Thymus satureioides* Coss. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2021.

El Hachlafi, N., Fikri-Benbrahim, K., Al-Mijalli, S.H., Elbouzidi, A., Jeddi, M., Abdallah, E.M., Assaggaf, H., Bouyahya, A., Alnasser, S.M.A., Attar, A., 2023b. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. essential oil as a promising source of bioactive compounds with antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and dermatoprotective properties: In vitro and in silico evidence. Heliyon.

El Hachlafi, N., Mrabti, H.N., Al-Mijalli, S.H., Jeddi, M., Abdallah, E.M., Benkhaira, N., Hadni, H., Assaggaf, H., Qasem, A., Goh, K.W., 2023c. Antioxidant, volatile compounds; antimicrobial, anti-inflammatory, and dermatoprotective properties of *Cedrus atlantica* (endl.) manetti ex carriere essential oil: in vitro and in silico investigations. Molecules 28, 5913.

El Hafidi, S., Bakhy, K., Ouhssine, M., Benzakour, A., Casanova, J., Paoli, M., Tomi, F., 2023. Integrated Analysis by GC/MS and 13C NMR of Moroccan *Cladanthus mixtus* Essential Oil; Identification of Uncommon Epoxyfarnesanes. Compounds 3, 365–375.

El Mihyaoui, A., Charfi, S., Erbiai, E.H., Pereira, M., Duarte, D., Vale, N., Candela Castillo, M.E., Badoc, A., Lamarti, A., Esteves da Silva, J.C., 2022. Phytochemical Compounds and Anticancer Activity of *Cladanthus mixtus* Extracts from Northern Morocco. Cancers 15, 152.

El Mihyaoui, A., Erbiai, E.H., Charfi, S., Pinto, E., Castillo, M.E.C., Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Badoc, A., Lamarti, A., Esteves da Silva, J.C., 2023. Chemical Characterization and Several Bioactivities of *Cladanthus mixtus* from Morocco. Molecules 28, 3196.

El Moussaoui, A., Jawhari, F.Z., Almehdi, A.M., Elmsellem, H., Benbrahim, K.F., Bousta, D., Bari, A., 2019. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*. L. Bioorganic Chemistry 93, 103337.

El-Akhal, F., Ramzi, A., Farah, A., Ez Zoubi, Y., Benboubker, M., Taghzouti, K., El Ouali Lalami, A., 2021. Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Lavandula angustifolia Subsp. angustifolia* and *Lavandula dentata* Spp. dentata Essential Oils against *Culex pipiens* Larvae, Vector of West Nile Virus. Psyche: A Journal of Entomology 2021, 1–7. https://doi.org/10.1155/2021/8872139

El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B., 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). Journal of Ethnopharmacology 86, 149–158. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00012-6

Elisa, F., 2018. Les Astéracées : description botanique, biologique et étude de plantes médicinales et toxiques.

Elouaddari, A., Amrani, A.E., Cayuela Sánchez, J.A., Bellahcen, T.O., Zouiten, A., Eddine, J.J., 2019a. Chemical composition and biological activities of the *Cladanthus mixtus* essential oil: A review. Analytical Chemistry Letters 9, 649–663.

Elouaddari, A., El Amrani, A., Eddine, J.J., Correia, A.I.D., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., 2013. 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 28, 360–366.

Elouaddari, A., Elamrani, A., Moutia, M., Oubrim, N., Habti, N., JamalEddine, J., 2019b. Chemical composition and evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of Moroccan *Cladanthus mixtus* essential oil and extracts. Journal of Essential Oil Bearing Plants 22, 1450–1466.

El-Tarabily, K.A., El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G.E., Khafaga, A.F., Elwan, H.A., Elnesr, S.S., Abd El-Hack, M.E., 2021. Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. Saudi Journal of Biological Sciences 28, 5145–5156.

ER Raouan, S., Abed, S.E., Zouine, N., Lachkar, M., Koraichi, S.I., 2023. Anti-adhesive activity of some secondary metabolites against *Staphylococcus aureus* on 3D printing medical materials. Archives of Microbiology 205, 243.

Ez Zoubi, Y., Fadil, M., Bousta, D., El Ouali Lalami, A., Lachkar, M., Farah, A., 2021. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: optimization using response surface methodology. Journal of Chemistry 2021, 1–11.

Fabre, R., Mérens, A., Lefebvre, F., Epifanoff, G., Cerutti, F., Pupin, H., Tardif, D., Cavallo, J.-D., Ternois, I., 2010. Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires communautaires. Médecine et maladies infectieuses 40, 555–559.

Fadil, M., Fikri-Benbrahim, K., Rachiq, S., Ihssane, B., Lebrazi, S., Chraibi, M., Haloui, T., Farah, A., 2018. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 126, 211–220.

Falleh, H., Ben Jemaa, M., Djebali, K., Abid, S., Saada, M., Ksouri, R., 2019. Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myrtus communis*, and *Lavandula stoechas* essential oils against *Escherichia coli*. Journal of Food Processing and Preservation 43, e14257.

Fennane, M., Tattou, M.I., 2008. Statistiques et commentaires sur l'inventaire actuel de la flore vasculaire du Maroc. Flora 1986.

Fiorini, C., 2003. Les plantes qui apaisent. Privat, Toulouse.

Floyd, K.A., Eberly, A.R., Hadjifrangiskou, M., 2017. Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices, in: Biofilms and Implantable Medical Devices. Elsevier, pp. 47–95.

Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Raimondo, F.M., Maggio, A., Bruno, M., 2012. Essential oil composition and antibacterial activity of *Anthemis mixta* and *A. tomentosa* (Asteraceae). Natural Product Communications 7, 1934578X1200701035.

Foti, M.C., 2007. Antioxidant properties of phenols. Journal of Pharmacy and Pharmacology 59, 1673–1685.

Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A., 2000. Les plantes médicinales de la plante au médicament; Observatoire du Monde des Plantes; Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège.

Gallotte, P., Fremondière, G., Gallois, P., Bernier, J.-P.B., Buchwalder, A., Walton, A., Piasentin, J., Fopa-Fomeju, B., 2020. *Lavandula angustifolia* Mill. and *Lavandula x Intermedia* Emeric Ex Loisel: Lavender and Lavandin, in: Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Springer, pp. 303–311.

Gao, Z., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Zhong, W., Chen, K., Guo, J., 2019. Anti-listeria activities of linalool and its mechanism revealed by comparative transcriptome analysis. Frontiers in Microbiology 10, 2947.

García-Sánchez, A., Miranda-Díaz, A.G., Cardona-Muñoz, E.G., 2020. The role of oxidative stress in physiopathology and pharmacological treatment with pro-and antioxidant properties in chronic diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2020.

Garzoli, S., Laghezza Masci, V., Franceschi, S., Tiezzi, A., Giacomello, P., Ovidi, E., 2021. Headspace/GC–MS analysis and investigation of antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of essential oils and hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Miller. Foods 10, 1768.

Garzoli, S., Turchetti, G., Giacomello, P., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., Ovidi, E., 2019. Liquid and vapour phase of lavandin (*Lavandula× intermedia*) essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. Molecules 24, 2701.

Ghasemi Pirbalouti, A., Firoznezhad, M., Craker, L., Akbarzadeh, M., 2013. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Revista Brasileira de Farmacognosia 23, 861–869. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600002

Ghavam, M., 2023. Heracleum persicum Desf. ex Fisch., CA Mey. & Avé-Lall. fruit essential oil: content, antimicrobial activity and cytotoxicity against ovarian cancer cell line. BMC Complementary Medicine and Therapies 23, 87.

Ghazghazi, H., Essghaier, B., Riguene, H., Rigane, G., El Aloui, M., Oueslati, M.A., SALEM, R.B., Zouaoui, N.S., NASERA, Z., Khouja, M.L., 2019. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *eucalyptus* essential oil: a comparative study between *eucalyptus marginata* L. and *eucalyptus paucilora* L. Revue Roumaine de Chimie 64, 1055–1062.

Giannenas, I., Sidiropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E., Florou-Paneri, P., 2020. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives, in: Feed Additives. Elsevier, pp. 1–18.

Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chemistry 119, 731–737.

Goetz, P., Ghedira, K., 2012. Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles, in: Phytothérapie Anti-Infectieuse. Springer, pp. 193–208.

Goupy, J., Creighton, L., 2007. Introduction to design of experiments with JMP examples. SAS publishing.

Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., 2008. Holst BK Landrum LR, Matsumoto K., Mazine FF, Nic Lughadha E., Proença C., Soares-Silva LH, Wilson PG, Lucas EJ 2008. World Checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.

Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T.G., Vilgalys, R., 1996. Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 12473–12477.

Graßmann, J., 2005. Terpenoids as plant antioxidants. Vitamins & Hormones 72, 505–535.

Grattapaglia, D., Vaillancourt, R.E., Shepherd, M., Thumma, B.R., Foley, W., Külheim, C., Potts, B.M., Myburg, A.A., 2012. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. Tree Genetics & Genomes 8, 463–508.

Greay, S.J., Hammer, K.A., 2015. Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. Phytochemistry reviews 14, 1–6.

Guerrouf Boutheyna-Mihoubi Fella, B.M.C.E., 2023. Revue bibliographique sur les plantes aromatiques algériennes: Composition chimique et vertus antiparasitaires et antifongique.

Guitton, Y., 2010. Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: aspects évolutifs et physiologiques. Université Jean Monnet-Saint-Etienne.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of ethnopharmacology 89, 67–71.

Hajjaj, G., Bahlouli, A., Tajani, M., Cherrah, Y., Zellou, A., 2016. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of *Ormenis mixta* L. fom Morocco. Int J Pharm Pharma Sci 8, 49–52.

Hajlaoui, H., Arraouadi, S., Noumi, E., Aouadi, K., Adnan, M., Khan, M.A., Kadri, A., Snoussi, M., 2021. Antimicrobial, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, and pharmacokinetic properties of *Carum carvi* L. and *Coriandrum sativum* L. essential oils alone and in combination. Molecules 26, 3625.

Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., Kadri, A., 2016. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. Microbial pathogenesis 95, 86–94.

Hancock, R.E., 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends in microbiology 5, 37–42.

Harden, G.J., 1990. Flora of New South Wales. UNSW Press.

Harkat-Madouri, L., Asma, B., Madani, K., Said, Z.B.-O.S., Rigou, P., Grenier, D., Allalou, H., Remini, H., Adjaoud, A., Boulekbache-Makhlouf, L., 2015. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. Industrial Crops and Products 78, 148–153.

Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., De Kok, R. de, Krestovskaja, T. de, Morales, R., 2004. Labiatae, in: Flowering Plants· Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae Including Avicenniaceae). Springer, pp. 167–275.

Harras, N., Lamarti, A., 2014. In vitro germination and plantlet establishment of wild chamomile of Morocco *Cladanthus mixtus* (L.) Oberpr. and Vogt. American Journal of Plant Sciences 2014.

Hashemi, S.M.B., Jafarpour, D., 2020. Synergistic properties of *Eucalyptus caesia* and *Dracocephalum multicaule* Montbr & Auch essential oils: Antimicrobial activity against food borne pathogens and antioxidant activity in pear slices. Journal of Food Processing and Preservation 44, e14651.

Hassan, W.N.F.W., Ismail, M.A., Lee, H.-S., Meddah, M.S., Singh, J.K., Hussin, M.W., Ismail, M., 2020. Mixture optimization of high-strength blended concrete using central composite design. Construction and Building Materials 243, 118251.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G., von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of agricultural and food chemistry 46, 3590–3595.

Herrera, C.M., 1988. Variation in mutualisms: the spatiotemporal mosaic of a pollinator assemblage. Biological Journal of the Linnean Society 35, 95–125.

Hesse, M., 2002. Alkaloids: Nature's curse or blessing John Wiley & Sons.

Hori, K., Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. Biochemical Engineering Journal 48, 424–434.

Horváth, G., Ács, K., 2015. Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: a review. Flavour and Fragrance Journal 30, 331–341.

Houti, H., Ghanmi, M., Satrani, B., Mansouri, F.E., Cacciola, F., Sadiki, M., Boukir, A., 2023. Moroccan endemic *Artemisia herba-alba* essential oil: GC-MS analysis and antibacterial and antifungal investigation. Separations 10, 59.

Hsouna, A.B., Halima, N.B., Abdelkafi, S., Hamdi, N., 2013. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: chemical composition and antimicrobial activities. Journal of Oleo Science 62, 973–980.

Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food chemistry 108, 986–995.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. Front. Microbio. 3. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.-P., 2007. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse.

Izadiyan, P., Hemmateenejad, B., 2016. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. Food chemistry 190, 864–870.

Jabir, M.S., Taha, A.A., Sahib, U.I., 2018. Antioxidant activity of Linalool. Eng. Technol. J 36.

Jaganjac, M., Tirosh, O., Cohen, G., Sasson, S., Zarkovic, N., 2013. Reactive aldehydes–second messengers of free radicals in diabetes mellitus. Free Radical Research 47, 39–48.

Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Trends in Food Science & Technology 34, 96–108.

Jeddi, M., El Hachlafi, N., El Fadili, M., Benkhaira, N., Al-Mijalli, S.H., Kandsi, F., Abdallah, E.M., Ouaritini, Z.B., Bouyahya, A., Lee, L.-H., 2023a. Antimicrobial, antioxidant, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of a chemically characterized essential oil from *Lavandula*

angustifolia Mill.: in vitro and in silico investigations. Biochemical Systematics and Ecology 111, 104731.

Jeddi, M., El Hachlafi, N., Fadil, M., Benkhaira, N., Jeddi, S., Benziane Ouaritini, Z., Fikri-Benbrahim, K., 2023b. Combination of Chemically-Characterized Essential Oils from *Eucalyptus polybractea*, *Ormenis mixta*, and *Lavandula burnatii*: Optimization of a New Complete Antibacterial Formulation Using Simplex-Centroid Mixture Design. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences 2023.

Jeddi, M., Fikri-Benbrahim, K., El Hachlafi, N., Benkhaira, N., Aboussemdai, A., Ouaritini, Z.B., 2023c. Chemical Composition of *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum* and *Vetiveria zizanoides* Essential oils and their Antibacterial and Antioxidant Activities. Tropical Journal of Natural Product Research 7.

Jeddi, M., Ouaritini, Z.B., Fikri-Benbrahim, K., 2021. Ethnobotanical study of medicinal plants in northern Morocco (Taounate): case of Mernissa. Ethnobotany Research and Applications 21, 1–23.

Jianu, C., Pop, G., Gruia, A.T., Horhat, F.G., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedi*a) grown in Western Romania. Int. J. Agric. Biol 15, 772–776.

Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W., 2022. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: A new antimicrobial therapy. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 62, 1740–1751.

Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. International Journal of Molecular Sciences 22, 4642.

Juan, L.W., Lucia, A., Zerba, E.N., Harrand, L., Marco, M., Masuh, H.M., 2011. Chemical composition and fumigant toxicity of the essential oils from 16 species of *Eucalyptus* against *Haematobia irritans* (*Diptera*: Muscidae) adults. Journal of Economic Entomology 104, 1087–1092.

Jugreet, B.S., Suroowan, S., Rengasamy, R.R.K., Mahomoodally, M.F., 2020. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. Trends in Food Science & Technology 101, 89–105. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025

Kachkoul, R., Benjelloun Touimi, G., Bennani, B., El Habbani, R., El Mouhri, G., Mohim, M., Sqalli Houssaini, T., Chebaibi, M., Koulou, A., Lahrichi, A., 2021. The synergistic effect of three essential oils against bacteria responsible for the development of Lithiasis infection: An optimization by the mixture design. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2021.

Kachur, K., Suntres, Z., 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical reviews in food science and nutrition 60, 3042–3053.

Kannappan, A., Gowrishankar, S., Srinivasan, R., Pandian, S.K., Ravi, A.V., 2017. Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbial pathogenesis 110, 313–324.

Karakaya, S., El, S.N., Karagozlu, N., Sahin, S., Sumnu, G., Bayramoglu, B., 2014. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. Journal of food science and technology 51, 1056–1065.

Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. Industrial crops and products 61, 41–48.

Khouchlaa, A., Tijane, M., Chebat, A., Hseini, S., Kahouadji, A., 2017. Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de la lithiase urinaire au Maroc. Phytothérapie 15, 274.

Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., Yoshikawa, Y., Nagai, T., Koyama, T., Nagai, S., Lange, A., Fässler, R., Sasakawa, C., 2009. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. Nature 459, 578–582.

King, D.J., Gleadow, R.M., Woodrow, I.E., 2006. Regulation of oil accumulation in single glands of Eucalyptus polybractea. New phytologist 172, 440–451.

King, H., 1935. 330. Curare alkaloids. Part I. Tubocurarine. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1381–1389.

Kirimer, N., Mokhtarzadeh, S., Demirci, B., Goger, F., Khawar, K.M., Demirci, F., 2017. Phytochemical profiling of volatile components of *Lavandula angustifolia* Miller propagated under in vitro conditions. Industrial Crops and Products 96, 120–125. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.061

Kıran, T.R., Otlu, O., Karabulut, A.B., 2023. Oxidative stress and antioxidants in health and disease. LaboratoriumsMedizin.

Kıvrak, Ş., 2018. Essential oil composition and antioxidant activities of eight cultivars of Lavender and Lavandin from western Anatolia. Industrial Crops and Products 117, 88–96.

Klein, E.Y., Milkowska-Shibata, M., Tseng, K.K., Sharland, M., Gandra, S., Pulcini, C., Laxminarayan, R., 2021. Assessment of WHO antibiotic consumption and access targets in 76 countries, 2000–15: an analysis of pharmaceutical sales data. The Lancet Infectious Diseases 21, 107–115.

Konaté, K., Mavoungou, J.F., Lepengué, A.N., Aworet-Samseny, R.R., Hilou, A., Souza, A., Dicko, M.H., M'Batchi, B., 2012. Antibacterial activity against β-lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants Staphylococcus aureus: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. Annals of clinical microbiology and antimicrobials 11, 1–12.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 3, a010306.

Kouassi, Y., Gbogouri, G., N'guessan, K., Bilgo, A., Angui, K.P., Ama, J., 2019. Effets de fertilisants organique et organominéral à base de dechets vegetaux et animaux sur la croissance et le rendement du soja (*glycine max* (l.) merrill) en zone de savane de Côte d'Ivoire. Agronomie Africaine 31, 21–32.

Kouki, H., Amri, I., Souihi, M., Pieracci, Y., Trabelsi, I., Hamrouni, L., Flamini, G., Hirsch, A.M., Mabrouk, Y., 2023. Chemical composition, antioxidant, herbicidal and antifungal activities of leaf essential oils from three Tunisian *Eucalyptus* species. Journal of Plant Diseases and Protection 130, 1411–1422.

Koumaglo, K.H., Dotse, K., Bettini, F., Bayle, J.-C., 2009. Composition chimique de l'huile essentielle de *Chromolaena odorata* (L) King et Robinson (Asteraceae) du Togo: Effets de séchage et du site de récolte. J. Soc. Ouest-Afr. Chem 28, 11–16.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food chemistry 85, 633–640.

Lafont, O., 2017. Vauquelin et l'école française de chimie végétale. Revue d'Histoire de la Pharmacie 104, 195–204.

Lahkimi, A., Nechad, I., Chaouch, M., Eloutassi, N., 2020. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *lavandula angustifolia* of the middle atlas central (Morocco). Moroccan Journal of Chemistry 8, 8-4 (2020) 905-918.

Lahlou, M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 18, 435–448.

Lahsissene, H., Kahouadji, A., Hseini, S., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). Lejeunia, revue de botanique.

Laid, M., Hegazy, M.-E.F., Ahmed, A.A., Ali, K., Belkacemi, D., Ohta, S., 2008. Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba-alba*. Phytochemistry Letters 1, 85–88. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.04.002

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of applied microbiology 91, 453–462.

Lee, J.-C., Kim, H.-R., Kim, J., Jang, Y.-S., 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Journal of agricultural and food chemistry 50, 6490–6496.

Lee, Y.-S., Kim, J., Shin, S.-C., Lee, S.-G., Park, I.-K., 2008. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. Flavour and Fragrance Journal 23, 23–28.

Lekbach, Y., Xu, D., El Abed, S., Dong, Y., Liu, D., Khan, M.S., Koraichi, S.I., Yang, K., 2018. Mitigation of microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* by *Cistus ladanifer* leaves extract. International Biodeterioration & Biodegradation 133, 159–169.

Leone, M., 2003. Infections urinaires nosocomiales en réanimation. Médecine et Maladies Infectieuses 33, 284–292.

Lesage-Meessen, L., Bou, M., Sigoillot, J.-C., Faulds, C.B., Lomascolo, A., 2015. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. Applied microbiology and biotechnology 99, 3375–3385.

Lieu, D.M., Vo, L.T.K., Le, H.G., Nguyen, T.T.B., Dang, T.T.K., 2024. Yeast cell as a potential microcapsule of bioactive compounds: an overview. Nutrire 49, 12. https://doi.org/10.1186/s41110-024-00257-8

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 517, 455–459.

Lis-Balchin, M., 2002. Lavender: the genus Lavandula. CRC press.

Liu, S., Zhao, C., Cao, Y., Li, Yan, Zhang, Z., Nie, D., Tang, W., Li, Yanling, 2023. Comparison of chemical compositions and antioxidant activity of essential oils from *Litsea Cubeba*, Cinnamon, Anise, and Eucalyptus. Molecules 28, 5051.

Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., Zuo, L., 2018. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. Frontiers in physiology 9, 477.

Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A.I., Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Cameán, A.M., 2015. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. Food and Chemical Toxicology 81, 9–27.

Lobo, Vijaya, Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews 4, 118.

Lobo, V, Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Phcog Rev 4, 118. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902

Lourenço, S.C., Moldão-Martins, M., Alves, V.D., 2019. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. Molecules 24, 4132.

Loying, R., Gogoi, R., Sarma, N., Borah, A., Munda, S., Pandey, S.K., Lal, M., 2019. Chemical compositions, in-vitro antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of essential oil of *Acorus calamus* L. rhizome from North-East India. Journal of Essential Oil Bearing Plants 22, 1299–1312.

Lucas, E.J., Holst, B., Sobral, M., Mazine, F.F., Nic Lughadha, E.M., Barnes Proença, C.E., Ribeiro da Costa, I., Vasconcelos, T.N., 2019. A new subtribal classification of tribe Myrteae (Myrtaceae). Systematic Botany 44, 560–569.

Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I., Haroutounian, S.A., 2002. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three *Greek Achillea* species. Zeitschrift für Naturforschung C 57, 287–290.

Mahmud, J., Muranyi, P., Salmieri, S., Lacroix, M., 2023. Optimization of a natural antimicrobial formulation against potential meat spoilage bacteria and food-borne pathogens: Mixture design methodology and predictive modeling. Microbial Pathogenesis 176, 106000.

Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S.M., 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food chemistry 210, 402–414.

Marker, R.E., Tsukamoto, T., Turner, D.L., 1940. Sterols. C. Diosgenin1. Journal of the American Chemical Society 62, 2525–2532.

Mau, J., 2003. Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. Food Chemistry 82, 583–591. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00014-1

Maurya, A.K., Aggarwal, G., Vashisath, S., Kumar, V., Agnihotri, V.K., 2023. Chemodiversity and α-Glucosidase Activity of *Eucalyptus* Species from Northwestern Himalaya, India. Chemistry & Biodiversity 20, e202300223.

Milde, J., Elstner, E.F., Grassmann, J., 2004. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ-terpinene, and ascorbic acid. Phytomedicine 11, 105–113.

Milos, M., Makota, D., 2012. 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 131, 296–299.

Mohammedi, H., Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., 2020. Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta montana* L. collected from different geographical regions in Algeria. Journal of essential oil research 32, 88–101.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT-Food Science and Technology 38, 565–570.

Mouhoub, A., Er Raouan, S., Guendouz, A., El Alaoui-Talibi, Z., Ibnsouda Koraichi, S., El Abed, S., Delattre, C., El Modafar, C., 2023. The effect of essential oils mixture on chitosan-based film surface energy and antiadhesion activity against foodborne bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 39, 77.

Moulay, S., Hassan, B., Alae, E., Meryem, A., Mohamed, M., Saad, I.K., Soumya, E., 2016. The anti-adherent activity of plant extracts on *Penicillium* commune spores causing cedar wood decay: An ESEM analysis. The Journal of Adhesion 92, 295–305.

Moussa, A.H.H., Benaliouche, F., Sbartai, I., Sbartai, H., 2023. Biological activities and chemical characterization of *Lavandula angustifolia* essential oil from Seraïdi, Northeastern Algeria. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 24.

Moussa, D.M., 2021. Caractérisation de l'activité contre les bactéries à Gram-négatif, expression hétérologue et étude de la relation structure activité des bactériocines produites par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369. Université de Lille.

Moussi Imane, M., Houda, F., Said Amal, A.H., Kaotar, N., Mohammed, T., Imane, R., Farid, H., 2017. Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Moroccan *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of Essential Oil Bearing Plants 20, 1074–1082.

Moussii, I.M., Nayme, K., Timinouni, M., Jamaleddine, J., Filali, H., Hakkou, F., 2020. Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and R*osmarinus officinalis* essential oils. Synergy 10, 100057.

Mrabti, H.N., Hachlafi, N.E., Al-Mijalli, S.H., Jeddi, M., Elbouzidi, A., Abdallah, E.M., Flouchi, R., Assaggaf, H., Qasem, A., Zengin, G., Bouyahya, A., Chahdi, F.O., 2023. Phytochemical profile, assessment of antimicrobial and antioxidant properties of essential oils of *Artemisia herba-alba* Asso., and *Artemisia dracunculus* L.: Experimental and computational approaches. Journal of Molecular Structure 1294, 136479. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136479

Mssillou, I., Agour, A., El Ghouizi, A., Hamamouch, N., Lyoussi, B., Derwich, E., 2020. Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Antifungal Effects of Essential Oil from *Laurus nobilis* L. Flowers Growing in Morocco. Journal of Food Quality 2020, e8819311. https://doi.org/10.1155/2020/8819311

Mujawah, A.A.H., Abdallah, E.M., Alshoumar, S.A., Alfarraj, M.I., Alajel, S.M.I., Alharbi, A.L., Alsalman, S.A., Alhumaydhi, F.A., 2022. GC-MS and in vitro antibacterial potential of *Cinnamomum camphora* essential oil against some clinical antibiotic-resistant bacterial isolates. European Review for Medical & Pharmacological Sciences 26.

Mukherji, R., Prabhune, A., 2015. A new class of bacterial quorum sensing antagonists: glycomonoterpenols synthesized using linalool and alpha terpineol. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31, 841–849.

Muller, A., Patry, I., Talon, D., Cornette, C., Lopez-Lozano, J.M., Plésiat, P., Bertrand, X., 2006. Mise en place d'un outil informatisé de surveillance de la résistance bactérienne et de la consommation antibiotique dans un centre hospitalier universitaire. Pathologie Biologie 54, 112–117.

Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D.N., Karbancioglu-Guler, F., Capanoglu, E., 2020. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. Molecules 25, 4711.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.

Myszka, K., Czaczyk, K., 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces-a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 61.

Najem, M., Ibijbijen, J., Nassiri, L., 2019. Quantitative ethnobotanical study of toxic plants used in the traditional pharmacopoeia of the central Middle Atlas-Morocco. Ethnobotany Research and Applications 18, 1–17.

Najibullah, S.N.M., Ahamad, J., Aldahish, A.A., Sultana, Shaheen, Sultana, Shehnaz, 2021. Chemical characterization and α-glucosidase inhibitory activity of essential oil of *Lavandula angustifolia* flowers. Journal of Essential Oil Bearing Plants 24, 431–438.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals 6, 1451–1474.

Nègre, R., 1962. Petite flores des régions arides du Maroc. Tome II 1, 281–282.

Nguyen, M.T., Kryachko, E.S., Vanquickenborne, L.G., 2003. General and theoretical aspects of phenols. The chemistry of phenols 1–198.

Nguyen-Ngoc, H., Giang, L.D., Tran-Trung, H., Thang, T.D., Tuan, N.H., Nguyen, D.K., Duc, N.D., Nhi, N.T.T., Le, C.T., An, N.T.G., 2024. Chemical constituents and *in vitro* antimicrobial activity of rhizome essential oils of *Zingiber densissimum* S.Q.Tong & Y.M.Xia and *Kaempferia laotica* Gagnep. growing wild in Vietnam. Journal of Essential Oil Bearing Plants 27, 73–81. https://doi.org/10.1080/0972060X.2024.2307905

Nicolle, D., 2013. Native *Eucalypts* of South Australia. Dean Nicolle.

Nieto, G., Ros, G., Castillo, J., 2018. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): A review. Medicines 5, 98.

Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews 67, 593–656.

Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 264, 382–388.

Nouioura, G., Tourabi, M., El Ghouizi, A., Kara, M., Assouguem, A., Saleh, A., Kamaly, O.A., El Ouadrhiri, F., Lyoussi, B., Derwich, E.H., 2023. Optimization of a New Antioxidant Formulation Using a Simplex Lattice Mixture Design of *Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L., and P*etroselinum crispum* M. Grown in Northern Morocco. Plants 12, 1175.

Ola, O.S., Sofolahan, T.A., 2021. A monoterpene antioxidant, linalool, mitigates benzene-induced oxidative toxicities on hematology and liver of male rats. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 8, 39–53.

Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P., Fonseca, A.P., 2001. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion.

Olle, M., Bender, I., 2010. The content of oils in umbelliferous crops and its formation.

Organisation mondiale de la Santé, 2021. Résistance aux antimicrobiens et plan-cadre de cooperation des Nations Unies pour le développement durable: Orientations pour les équipes de pays des Nation Unies. Food & Agriculture Org.

Organisation mondiale de la Santé, 2013. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. Organisation mondiale de la Santé.

Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K.-A., Hermansson, M., 2001. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. Journal of bacteriology 183, 2445–2453.

Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Harki, E.H., Moja, S., Greche, H., 2018. Antioxidant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* and *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. Environmental Science and Pollution Research 25, 29860–29867.

Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F.O., Taleb, M., Greche, H., 2016. Mixture design of *Origanum compactum, Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. Industrial Crops and Products 89, 1–9.

Ouedrhiri, W., Mechchate, H., Moja, S., Baudino, S., Saleh, A., Al Kamaly, O.M., Grafov, A., Greche, H., 2022. Optimized antibacterial effects in a designed mixture of essential oils of *Myrtus communis*, *Artemisia herba-alba* and *Thymus serpyllum* for wide range of applications. Foods 11, 132.

Ouedrhiri, W., Mounyr, B., Harki, E.H., Moja, S., Greche, H., 2017. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. International Journal of Food Properties 20, 3149–3158.

Ozenda, P., 1992. Flore et végétation du Sahara. Geobios 25, 305–305.

Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., Capanoglu, E., 2019. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. Food chemistry 272, 494–506.

Oztetik, E., 2011. An introduction to oxidative stress in plants and the role of non-enzymatic antioxidants. Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi 1–50.

Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 577–588.

Passalacqua, N.G., Tundis, R., Upson, T.M., 2017. A new species of Lavandula sect. Lavandula (Lamiaceae) and review of species boundaries in *Lavandula angustifolia*. Phytotaxa 292, 161-170-161–170.

Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Sant'Ana, A.S., Khaneghah, A.M., Gavahian, M., Gómez, B., Lorenzo, J.M., 2018. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. Food Research International 113, 156–166.

Pateiro, M., Munekata, P.E., Sant'Ana, A.S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., Lorenzo, J.M., 2021. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. International Journal of Food Microbiology 337, 108966.

Patil, S.M., Patel, P., 2021. Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics. Infections and Sepsis Development 3.

Pei, R., Zhou, F., Ji, B., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. Journal of food science 74, M379–M383.

Pelletier, G., 2024. Génétique des domestications. ISTE Group.

Pelletier, P.J., Caventou, J.B., 1818. Note sur un nouvel Alcali. Ann. Chim. Phys 8, 323.

Pereira, M.C., Steffens, R.S., Jablonski, A., Hertz, P.F., de O. Rios, A., Vizzotto, M., Flôres, S.H., 2012. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. Journal of agricultural and food chemistry 60, 3061–3067.

Perez-Cortes, P., Escalante-Garcia, J.I., 2020. Design and optimization of alkaline binders of limestone-metakaolin–A comparison of strength, microstructure and sustainability with portland cement and geopolymers. Journal of Cleaner Production 273, 123118.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian journal of clinical biochemistry 30, 11–26.

Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J., 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 18, 73–78.

Pirali-Kheirabadi, K., da Silva, J.A.T., 2010. *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control. Experimental Parasitology 126, 184–186.

Pistelli, L., Najar, B., Giovanelli, S., Lorenzini, L., Tavarini, S., Angelini, L.G., 2017. Agronomic and phytochemical evaluation of lavandin and lavender cultivars cultivated in the Tyrrhenian area of Tuscany (Italy). Industrial Crops and Products 109, 37–44.

Pljevljakusic, D., Kostadinovic Velickovska, S., Mihajlov, L., Cherepnalkoski, A., 2023. Chemical composition and biological activity of lavandin and lavander essential oils. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 100, 91–103.

Pokajewicz, K., Białoń, M., Svydenko, L., Fedin, R., Hudz, N., 2021. Chemical composition of the essential oil of the new cultivars of *Lavandula angustifolia* Mill. Bred in Ukraine. Molecules 26, 5681.

Pokajewicz, K., Czarniecka-Wiera, M., Krajewska, A., Maciejczyk, E., Wieczorek, P.P., 2023a. *Lavandula× intermedia*—A Bastard Lavender or a Plant of Many Values? Part I. Biology and Chemical Composition of Lavandin. Molecules 28, 2943.

Pokajewicz, K., Czarniecka-Wiera, M., Krajewska, A., Maciejczyk, E., Wieczorek, P.P., 2023b. *Lavandula x intermedia*—A Bastard Lavender or a Plant of Many Values? Part II. Biological Activities and Applications of Lavandin. Molecules 28, 2986.

Poli, J.-P., Guinoiseau, E., de Rocca Serra, D., Sutour, S., Paoli, M., Tomi, F., Quilichini, Y., Berti, L., Lorenzi, V., 2018. Anti-Quorum Sensing Activity of 12 Essential Oils on *Chromobacterium violaceum* and Specific Action of cis-cis-p-Menthenolide from Corsican *Mentha suaveolens* ssp. Insularis. Molecules 23, 2125.

Polito, F., Fratianni, F., Nazzaro, F., Amri, I., Kouki, H., Khammassi, M., Hamrouni, L., Malaspina, P., Cornara, L., Khedhri, S., 2023. Essential Oil Composition, Antioxidant Activity and Leaf Micromorphology of Five Tunisian *Eucalyptus* Species. Antioxidants 12, 867.

Pomatto, L.C., Davies, K.J., 2018. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. Free Radical Biology and Medicine 124, 420–430.

Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT-Food Science and Technology 36, 679–684.

Prakash, B., Singh, P., Goni, R., Raina, A.K.P., Dubey, N.K., 2015. Efficacy of *Angelica archangelica* essential oil, phenyl ethyl alcohol and α-terpineol against isolated molds from walnut and their antiaflatoxigenic and antioxidant activity. Journal of food science and technology 52, 2220–2228.

Radi, F.Z., Zekri, N., Drioiche, A., Zerkani, H., Boutakiout, A., Bouzoubaa, A., Zair, T., 2022. Volatile and Non-Volatile Chemical Compounds and Biological Power of the genus Lavandula: Case of two Moroccan Lavenders *Lavandula angustifolia* Mill.(Cultivated Lavander) and *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.(Spontaneous Lavander). Egyptian Journal of Chemistry 65, 273–294.

Rankou, H., Culham, A., Jury, S.L., Christenhusz, M.J., 2013. The endemic flora of Morocco. Phytotaxa 78, 1–69.

Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A.R., Ochoa-Velasco, C.E., Palou, E., López-Malo, A., Ávila-Sosa, R., 2020. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. Critical reviews in food science and nutrition 60, 1641–1650.

Rice-evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free radical research 22, 375–383.

Roosta, R.A., Moghaddasi, R., Hosseini, S.S., 2017. Export target markets of medicinal and aromatic plants. Journal of applied research on medicinal and aromatic plants 7, 84–88.

Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food chemistry 69, 167–174.

Sadiki, M., Balouiri, M., Barkai, H., Maataoui, H., Koraichi, S.Ibnsoud., Elabed, S., 2014. Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. Int J Pharm Pharm Sci 6.

Sadiki, M., Elabed, S., Barkai, H., Laachari, F., Koraichi, S.I., 2015. The impact of *Thymus vulgaris* extractives on cedar wood surface energy: Theoretical and experimental of *Penicillium* spores adhesion. Industrial Crops and Products 77, 1020–1027.

Said, Z.B.-O.S., Haddadi-Guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khoudja, N.K., Madani, K., 2016. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistillated extract of *Eucalyptus globulus* fruits. Industrial Crops and Products 89, 167–175.

Salman, I.A.S., 2018. Biosurfactant as a preventive agent on acrylic resin. Mustansiria Dental Journal 15, 83–89.

Salvatori, O., Puri, S., Tati, S., Edgerton, M., 2016. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*–mediated oral diseases. Journal of dental research 95, 365–371.

Samadi, N., Manayi, A., Vazirian, M., Samadi, M., Zeinalzadeh, Z., Saghari, Z., Abadian, N., Mozaffarian, V.-O.-A., Khanavi, M., 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis altissima* L. var. altissima. Natural product research 26, 1931–1934.

Samarth, R.M., Samarth, M., Matsumoto, Y., 2017. Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. Future Science OA 3, FSO247. https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0061

Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M., 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food control 19, 1070–1075.

Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo, A., 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. Journal of applied microbiology 102, 486–497.

Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus.* Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux 146, 85–96.

Sawa, C., Tendonkeng, F., Miegoue, E., Beavogui, F., Kourouma, M., Tedonkeng, E.P., 2018. Effet résiduel de la fertilisation minérale et du stade phénologique sur la croissance et la biomasse de Paspalum plicatulum. International Journal of Biological and Chemical Sciences 12, 2132–2142.

Sebei, K., Sakouhi, F., Herchi, W., Khouja, M.L., Boukhchina, S., 2015. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. Biological research 48, 1–5.

Senanayake, S.N., 2013. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications–A review. Journal of functional foods 5, 1529–1541.

Shah, B.B., Mehta, A.A., 2018. In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. Asian J. Pharm. Pharmacol 4, 883–887.

Sharma, A.D., Agnish, S., Inderjeet, K., 2022. Chemical composition analysis and biological activities of essential oil from *Eucalyptus polybractea* (L.), growing in plains of Punjab, Northern India, by two different hydro-distillation methods. Notulae Scientia Biologicae 14, 11191–11191.

Sharma, D., Misba, L., Khan, A.U., 2019. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrobial Resistance & Infection Control 8, 1–10.

Sharma, N., 2014. Free Radicals, Antioxidants and Disease. Biol Med (Aligarh) 06. https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000214

Sharopov, F.S., Salimov, A., Numonov, S., Bakri, M., Sangov, Z., Habasi, M., Aisa, H.A., Setzer, W.N., 2020. Phytochemical study on the essential oils of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) growing in Tajikistan and its comparison with the essential oil of the species in the rest of the world. Natural Product Communications 15, 1934578X20977394.

Silva, F., Domingues, F.C., 2017. Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. Critical reviews in food science and nutrition 57, 35–47.

Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. Journal of medical microbiology 60, 1479–1486.

Silva, V.A., Sousa, J.P., Guerra, F.Q.S., Pessôa, H.L.F., Freitas, A.F.R., Alves, L.B.N., Lima, E.O., 2015. Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and linalool on bacterial isolates of clinical importance. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 7, 1066–1071.

Singer, A.C., Shaw, H., Rhodes, V., Hart, A., 2016. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. Frontiers in microbiology 7, 1728.

Singh, H.P., Mittal, S., Kaur, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2009. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 6962–6966.

Singh, S., Tewari, G., Pande, C., Singh, C., 2013. Variation in essential oil composition of *Ocimum americanum* L. from north-western Himalayan region. Journal of Essential Oil Research 25, 278–290.

Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. Journal of Agricultural and Food chemistry 43, 2384–2388.

Slimani, C., Sqalli, H., Chaimae, R., Farah, A., Lazraq, A., El Ghadraoui, L., Belmalha, S., Echchgadda, G., 2022. Chemical composition and evaluation of biological effects of essential oil and aqueous extract of *Lavandula angustifolia* L. Notulae Scientia Biologicae 14, 11172–11172.

Smigielski, K., Raj, A., Krosowiak, K., Gruska, R., 2009. Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* cultivated in Poland. Journal of Essential Oil Bearing Plants 12, 338–347.

Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven, L.J., 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. Molecules 15, 7532–7546.

Sokovic, M., Marin, P.D., Brkic, D., van Griensven, L.J., 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against human pathogenic bacteria. Food 1, 220–226.

Souiy, Z., Elaissi, A., Jlassi, I., Sghair, W., Allouch, N., Mastouri, M., Krifia, B., 2021. Application of Simplex-Centroid Design Methodologies to Optimize the Anti-bacterial and Anti-candidal Activity of the Mixture of *Mentha pulegium, Pituranthos chloranthus* and *Thymus algeriensis* Essential Oils. Med. Aromat. Plants 10, 365.

Soussi, M., Fadil, M., Yaagoubi, W.A., Benjelloun, M., El Ghadraoui, L., 2022. Simultaneous Optimization of Phenolic Compounds and Antioxidant Abilities of Moroccan *Pimpinella anisum* Extracts Using Mixture Design Methodology. Processes 10, 2580.

Squeo, G., De Angelis, D., Leardi, R., Summo, C., Caponio, F., 2021. Background, applications and issues of the experimental designs for mixture in the food sector. Foods 10, 1128.

Srivastava, J., Lambert, J., Vietmeyer, N., 1996. Medicinal plants: An expanding role in development. World Bank Publications.

Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino acids 25, 207–218.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959–964.

Tabatabaei, S.M., Kianinodeh, F., Nasiri, M., Tightiz, N., Asadipour, M., Gohari, M., 2018. In vitro inhibition of MCF-7 human breast cancer cells by essential oils of *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris* L., and *Lavender x intermedia*. Archives of breast Cancer 81–89.

Tadrent, WAFA, Bachari, K., Kabouche, Z., 2016. Comparative Compositions and Antibacterial Activity of the essential oils of *Anthemis nobilis* l. and *Anthemis mixta* l.(asteraceae). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 8, 457–59.

Tadrent, W, Kabouche, A., Touzani, R., Kabouche, Z., 2016. Chemotypes investigation of essential oils of *Chamomile* herbs: A short review. J. Mater. Environ. Sci 7, 1229–1235.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L., Morelli, I., 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathologia 159, 339–345.

Tavakolpour, Y., Moosavi-Nasab, M., Niakousari, M., Haghighi-Manesh, S., Hashemi, S.M.B., Mousavi Khaneghah, A., 2017. Comparison of four extraction methods for essential oil from *Thymus daenensis* Subsp. Lancifolius and chemical analysis of extracted essential oil. Journal of Food Processing and Preservation 41, e13046.

Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Food chemistry 84, 519–525.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. sipyleus and Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. rosulans. Journal of Food Engineering 66, 447–454.

Theou, G., Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2013. Fumigant toxicity of six essential oils to the immature stages and adults of *Tribolium confusum*. Hell. Plant Prot. J 6, 29–39.

Todorova, V., Ivanov, K., Georgieva, Y., Karcheva-Bahchevanska, D., Ivanova, S., 2023. Comparison between the Chemical Composition of Essential Oil from Commercial Products and Biocultivated *Lavandula angustifolia* Mill. International Journal of Analytical Chemistry 2023.

Togashi, N., Hamashima, H., Shiraishi, A., Inoue, Y., Takano, A., 2010. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. Journal of Essential Oil Research 22, 263–269.

Tolba, H., 2017. Extraction des huiles essentielles des plantes de la flore algérienne, Etude des effets thérapeutiques en vue d'une application pharmaceutique. Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés.

Tolba, H., Moghrani, H., Benelmouffok, A., Kellou, D., Maachi, R., 2015. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. Journal de mycologie medicale 25, e128–e133.

Tortosa, V., Pietropaolo, V., Brandi, V., Macari, G., Pasquadibisceglie, A., Polticelli, F., 2020. Computational methods for the identification of molecular targets of toxic food additives. Butylated hydroxytoluene as a case study. Molecules 25, 2229.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial agents and chemotherapy 49, 2474–2478.

Tronet, J., Pinet-Dessein, J., 2009. La résine acrylique. L'Orthodontie Française 80, 49–50.

Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J., 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. International journal of food microbiology 144, 480–486.

Tsigoriyna, L., Sango, C., Batovska, D., 2024. An Update on Microbial Biosynthesis of β-Caryophyllene, a Sesquiterpene with Multi-Pharmacological Properties. Fermentation 10, 60. https://doi.org/10.3390/fermentation10010060

Ultee, Annemieke, Bennik, M., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology 68, 1561–1568.

Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 68, 1561–1568. https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002

Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice. Journal of food protection 63, 620–624.

Usman, L.A., Oguntoye, O.S., Ismaeel, R.O., 2022. Phytochemical Profile, Antioxidant and Antidiabetic Potential of Essential Oil From Fresh and Dried Leaves of *Eucalyptus globulus*. Journal of the Chilean Chemical Society 67, 5453–5461.

Van Oss, C.J., 1995. Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 5, 91–110.

Van Vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M., 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Letters in applied microbiology 48, 440–446.

Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and therapeutics 40, 277.

Verdeguer, M., Blázquez, M.A., Boira, H., 2009. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. Biochemical Systematics and Ecology 37, 362–369.

Vieira, M., Bessa, L.J., Martins, M.R., Arantes, S., Teixeira, A.P., Mendes, Â., Martins da Costa, P., Belo, A.D., 2017. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. Chemistry & biodiversity 14, e1700006.

Voinovich, D., Campisi, B., Phan-Tan-Luu, R., Beal, A., 2020. Experimental design for mixture studies.

Vuuren, S. van, Viljoen, A.M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. Flavour and fragrance journal 22, 540–544.

Walasek-Janusz, M., Grzegorczyk, A., Zalewski, D., Malm, A., Gajcy, S., Gruszecki, R., 2022. Variation in the Antimicrobial Activity of Essential Oils from Cultivars of *Lavandula angustifolia* and *L.*× *intermedia*. Agronomy 12, 2955.

Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules 17, 2704–2713.

Weber, R.W., 2013. Adverse reactions to the antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Food allergy: adverse reactions to foods and food additives 393–401.

Wei, A., Shibamoto, T., 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. Journal of agricultural and food chemistry 58, 7218–7225.

Weinberg, B.A., Bealer, B.K., 2004. The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug. Routledge.

Wilson, P.G., 2010. Myrtaceae, in: Flowering Plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer, pp. 212–271.

Yu, D., Wang, Ling, Zhou, H., Zhang, X., Wang, Lei, Qiao, N., 2019. Fluorimetric detection of *Candida albicans* using cornstalk N-carbon quantum dots modified with amphotericin B. Bioconjugate Chemistry 30, 966–973.

Zengin, G., Sarikürkçü, C., Aktümsek, A., Ceylan, R., 2016. Antioxidant potential and inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's diseases and diabetes mellitus by monoterpene-rich essential oil from *Sideritis galatica* Bornm. Endemic to Turkey. Records of Natural Products 10, 195.

Zeouk, I., Ouedrhiri, W., Jiménez, I.A., Lorenzo-Morales, J., Bazzocchi, I.L., Bekhti, K., 2020. Intra-combined antioxidant activity and chemical characterization of three fractions from *Rhamnus alaternus* extract: Mixture design. Industrial crops and products 144, 112054.

Zhang, T., Zheng, Y., Fu, C., Yang, H., Liu, X., Qiu, F., Wang, X., Wang, Z., 2023. Chemical variation and environmental influence on essential oil of *Cinnamomum camphora*. Molecules 28, 973.

Zhang, Z., Liu, M., Wang, Y., Pang, Y., Kam, K.M., Zhao, Y., 2014. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China. European journal of clinical microbiology & infectious diseases 33, 1959–1966.

Zhannan, Y., Shiqiong, L., Quancai, P., Chao, Z., Zhengwen, Y., 2009. GC-MS analysis of the essential oil of coral ginger (*Zingiber corallinum* Hance) Rrhizome obtained by supercritical fluid extraction and steam distillation extraction. Chromatographia 69, 785–790.

Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A., 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.(Lamiaceae). Food and bioproducts processing 89, 257–265.

Zouine, N., Raouan, S.E., Elharchli, E., El Ghachtouli, N., El Abed, S., Sadiki, M., Koraichi, S.I.S., 2022. Theoretical and experimental investigations of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on 3D printed resin. International Journal of Adhesion and Adhesives 118, 103234.

Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B., 2003. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco—a seasonal variation. Flavour and fragrance journal 18, 475–480.

Zrira, S., Menut, C., Bessiere, J.M., Benjilalii, B., 2007. Chemical composition of the essential oils of Moroccan *Ormenis mixta* (L.) Dumort. ssp. multicaulis. Journal of Essential Oil Bearing Plants 10, 378–385.