

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université El-wancharissi de Tissemsilt



Institut Des Sciences et Technologies
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques – Spécialité : Biologie Végétale

THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme Doctorat 3^{ème} cycle LMD

Par

M^{lle} MEHARRAR Nadjjet

Thème

**Contribution à l'étude chimique et biologique des huiles
essentielles de *Cistus salviifolius* L.**

Soutenue publiquement le Jeudi **08-07-2021** devant le jury d'examen composé de:

Président	Pr. AICHOUNI Ahmed	Université de Tissemsilt
Directeur de thèse	Pr. BEKADA Ahmed Med Ali	Université de Tissemsilt
Examineur	Pr. BEGHALIA Mohamed	Université de Tissemsilt
Examineur	Pr. HASSANI Abdelkrim	Université de Tiaret
Examinatrice	Pr DOUKANI Koula	Université de Tiaret

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université El-wancharissi de Tissemsilt



Institut Des Sciences et Technologies
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques – Spécialité : Biologie Végétale

THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme Doctorat 3^{ème} cycle LMD

Par

M^{lle} MEHARRAR Nadjat

Thème

**Contribution à l'étude chimique et biologique des huiles
essentielles de *Cistus salviifolius* L.**

Soutenue publiquement le Jeudi **08-07-2021** devant le jury d'examen composé de:

Président	Pr. AICHOUNI Ahmed	Université de Tissemsilt
Directeur de thèse	Pr. BEKADA Ahmed Med Ali	Université de Tissemsilt
Examineur	Pr. BEGHALIA Mohamed	Université de Tissemsilt
Examineur	Pr. HASSANI Abdelkrim	Université de Tiaret
Examinatrice	Pr DOUKANI Koula	Université de Tiaret

Année universitaire : 2020-2021



Remerciements

Tous d'abord merci à الله de nous avoir guidé à accomplir ce travail.

Mes vifs remerciements vont à mon directeur de thèse **Mr BEKADA Ahmed Med Ali** Professeur à l'université de Tissemsilt qui m'a fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail, il soit assuré de ma plus profonde reconnaissance et de mes chaleureux remerciements pour son soutien et sa disponibilité tout au long de cette étude.

Ses conseils pertinents, sa compétence scientifique et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail. Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse:

Pr AICHOUNI Ahmed, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Pr. BEGHALIA Mohamed, professeur à l'université de Tissemsilt, **Pr DOUKANI Koula**, Professeur à l'université de Tiaret, **Pr. HASSANI Abdelkrim** professeur à l'université de Tiaret, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe des ingénieurs du Parc National de Theniet el had et plus particulièrement **Mr BELKAID Boualem** et **Mr BEGHOUL** qui m'ont aidé dans l'identification de l'espèce végétale sélectionnée.

Je tiens à remercier **Mr AIT SAADA Djamel** professeur à l'université de Mostaganem et directeur du laboratoire de technologie alimentaire de m'avoir accueillir dans son laboratoire, sa disponibilité et son soutien, sans oublier toute l'équipe de laboratoire.

Mes plus profonds remerciements s'adressent au **Mr ARABI Abed** de l'université de Mostaganem pour son aide matériel qui m'a permis de mener à bien la partie d'hydrodistillation de ce travail.

Je remercie vivement **Mr. Le Doyen** de la Faculté des sciences de la matière de l'université IBN Khaldoun- Tiaret ainsi toute l'équipe de laboratoire de chimie de cette faculté pour l'aquiel, l'aide et l'accompagnement tout au long de ce travail, je remercie tout particulièrement **Mr BOUHADJAR**, **Mr Aoued** et **Mr LARBI**, pour leur aide.

Mme Andria BASIL, **Mr DOMMES J**, je leurs expriment ici toute ma reconnaissance pour leurs rôles importants dans l'achèvement de ce travail.

Enfin, mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du centre universitaire de Tissemsilt et tous les enseignants du département Science de la nature et de la vie.

... Dédicaces

*Je dédie ce travail à **mes parents** ;*

*À l'esprit de mon père **BRAHIM** qui restera toujours dans mon cœur.*

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,

L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu

Pour vous.

*A mon très chère professeur : **Mr BEKADA Ahmed Med Ali**, qui a fait preuve d'une grande patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Ses conseils, ses orientations ainsi que son soutien moral et scientifique nous a permis de mener à terme ce projet. Son encadrement était des plus exemplaires. Qu'il trouve ici, le témoignage d'une profonde gratitude.*

Votre encadrement a toujours suscité mon profond respect. Je vous remercie pour votre accueil et vos conseils puisse dieu, le tout puissant te préserver et t'accorder santé, langue vie et paradis.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, mon futur mari, à tous mes frères et mes sœurs, mes belles-sœurs, mes beaux-frères, mes nièces, et mes neveux sans exceptions.

Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures.

تقدم أجناس *Cistus* مجموعات من حوالي عشرين نوعًا من الشجيرات التي تنتمي إلى عائلة *Cistaceae*، وهي شائعة جدًا في جميع أنحاء منطقة البحر الأبيض المتوسط.

Cistus salviifolius L ، ويسمى عادة سفيرا أو ميليا هو نوع من جنس *Cistus* الموجود في منطقة الغابات في جبل الوئشريس (شمال غرب الجزائر) ، بالضبط في الحديقة الوطنية في ثنية الحد في ولاية تيسمسيلت.

أجريت هذه الدراسة لتقييم التأثيرات المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي المستخلص من النوع النباتي *C. salviifolius* بطريقة التقطير المائي (Clevenger) وتحديد تركيبه الكيميائي وكذلك فحص تأثير وقت التجفيف في الظل على إنتاج هذه الزيوت العطرية من أجل تحسين هذه المعلمة. والتي غالبًا ما تظل غير خاضعة للمراقبة للمنتجين.

بلغت انتاجية الزيت الأساسي المسجل $0.07 \pm 0.02\%$ والذي بلغ أوجه في اليوم الثالث من التجفيف يُظهر توصيفه بواسطة كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي وجود 39 مكونًا.

سجلت سيكربتريينات مؤكسجة (30.76%) ، ومونوترينينات مؤكسجة (17.94%) ، ومثابنات هيدروكربون هيدروكربونية ، وإسترات ، وديتريينات ومركبات أخرى نسبة معادلة بلغت 12.82%.

تهيمن عليها بشكل غالب مجموعات كيميائية تنتمي إلى *sesquiterpènes* المؤكسج (30.76%) ، *monoterpènes* المؤكسج (17.94%) ، هيدروكربون سيسكيتيرينينات ، إسترات ، ديتيربين والتي تسجل نسبة تعادل 12.82%.

أظهر المضاد الحيوي الذي تم إجراؤه بواسطة طريقة الأجار المتوسطة الانتشار أن المضادات الحيوية التي أعطت أكبر مناطق التثبيط تتمثل في Fosfomycin ضد *Staphylococcus aureus* (30.20mm) ، Kanamycin ضد *Bacillus subtilis* (28.50mm) ، Ceftazidime و Rifampicin ضد *Pseudomonas aeruginosa* (27.10 و 27.10 ملم على التوالي).

ثبت أن النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية التي تم قياسها في المختبر مهم ، وأقطار مناطق التثبيط (CMI) التي تم الحصول عليها هي من الترتيب 24.7 ، 23.6 ، 16.07 ، 14.74 ، 12.00 ، 9.00 ملم ضد جراثيم *enterica* و *Salmonella* و *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* و *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* ، بينما كانت قيم $1/3000$ ، $1/2000$ ، $1/250$ ، $1/4000$ ، $1/250$ ، $1/250$ (v/v).

في ضوء نتائج هذه الدراسة، يمكن تطوير عوامل جديدة مضادة للجراثيم وتشجيع استخدام *C. salviifolius L* في صناعات الأدوية ومستحضرات التجميل.

الكلمات الرئيسية: *Cistus salviifolius L*؛ زيت أساسي؛ تجفيف؛ انتاجية؛ تركيبية كيميائية؛ نشاط مضاد للجراثيم.

Abstract

The genera *Cistus* present groups of about twenty species of shrubs. They belong to the family of Cistaceae, which are very common throughout the Mediterranean region.

Cistus salviifolius L, commonly called Cfeira or Melliya. It is a species of the genus *Cistus* which is found in the forest region of Mount Ouarsenis (north-west Algeria), exactly in the National Park of Theniet El Had in the Wilaya of Tissemsilt.

This study was undertaken to evaluate the antibacterial effects of the essential oil of *C. salviifolius* L. obtained by hydrodistillation (Clevenger type), and to identify its chemical composition as well as the examination of the effect of the drying time in the shade on the yield of essential oil, in order to optimize this parameter which will most often remain uncontrolled for producers.

The optimum yield recorded is about $0.07 \pm 0.02\%$, obtained during the third day of drying. The characterization of the essential oil by gas chromatography coupled with mass spectrometry, shows the existence of 39 components, dominated essentially by chemical groups belonging to oxygenated sesquiterpenes (30.76%), oxygenated monoterpenes (17.94%), hydrocarbon sesquiterpenes, esters, diterpenes which register an equivalent percentage of 12.82%.

Antibiogram performed by the agar diffusion method revealed that the antibiotics with the largest inhibition zones are Fosfomycin against *Staphylococcus aureus* (30.20mm), Kanamycin against *Bacillus subtilis* (28.50mm), Ceftazidime and Rifampicin against *Pseudomonas aeruginosa* (27.20 and 27.10 mm respectively).

The antibacterial activity of the essential oils measured in vitro was interesting, the diameters of inhibition zones obtained being of the order of 24.7, 23.6, 16.07, 14.74, 12.00, 9.00mm against the respective germs *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, while the respective MIC values recorded were 1/3000, 1/2000, 1/250, 1/4000, 1/250, 1/250 (v/v).

Based on the results of this study, new antibacterial agents could be developed and the use of *C. salviifolius* L should be encouraged in the pharmaceutical, and cosmetic industries.

Keywords: *Cistus salviifolius* L; essential oil; drying; yield; chemical composition; antibacterial activity

Résumé

Les genres *Cistus* présentent des groupes d'une vingtaine d'espèces d'arbustes, appartenant à la famille des Cistacées, qui sont très communs dans toute la région méditerranéenne.

Cistus salviifolius L, communément appelé Cfeira ou Melliya est une espèce du genre *Cistus* qui se trouve dans la région forestière du Mont Ouarsenis (nord-ouest de l'Algérie), exactement dans le Parc National de Theniet El Had dans la Wilaya de Tissemsilt.

Cette étude a été entreprise pour évaluer les effets antibactériens de l'huile essentielle de *C. salviifolius* L. obtenue par hydrodistillation (type Clevenger), et d'identifier sa composition chimique, ainsi que l'examen de l'effet du temps de séchage à l'ombre sur le rendement en huile essentielle afin d'optimiser ce paramètre, qui restera le plus souvent non contrôlé pour les producteurs.

Le rendement optimal enregistré est d'environ $0,07 \pm 0,02\%$, obtenu durant la troisième journée de séchage. La caractérisation de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, montre l'existence de 39 composants, dominés essentiellement par les groupements chimiques appartenant aux sesquiterpènes oxygénés (30.76%), les monoterpènes oxygénés (17.94%), les sesquiterpènes hydrocarbonés, les esters, les diterpènes qui enregistrent un pourcentage équivalent de 12.82%.

L'antibiogramme effectué par la méthode de diffusion en milieu gélosé a révélé que les antibiotiques ayant donné les plus grandes zones d'inhibition sont représentés par la Fosfomycine contre *Staphylococcus aureus* (30.20mm), la Kanamycine contre *Bacillus subtilis* (28.50mm), la Ceftazidime et Rifampicine contre *Pseudomonas aeruginosa* (27.20 et 27.10 mm respectivement).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles mesurée *in vitro* s'est montrée intéressante, les diamètres de zones d'inhibition obtenus étant de l'ordre de 24.7, 23.6, 16.07, 14.74, 12.00, 9.00 mm à l'encontre des germes respectifs *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, alors que les valeurs de CMI respectives enregistrées étant de 1/3000, 1/2000, 1/250, 1/4000, 1/250, 1/250 (v/v).

Compte tenu des résultats de cette étude, de nouveaux agents antibactériens pourraient être développés et l'utilisation de *C. salviifolius* L. devrait être encouragée dans les industries pharmaceutiques et en cosmétique.

Mots-clés: *Cistus salviifolius* L ; huile essentielle ; séchage ; rendement ; composition chimique ; activité antibactérienne.

TABLE DE MATIERE

TABLE DE MATIERE

ملخص.....	I
Abstract.....	II
Résumé.....	III
Table de matières.....	IV
Liste des abréviations.....	IX
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures.....	XIV
Introduction.....	1

Partie Bibliographique

Chapitre I. Généralités sur les huiles essentielles

I. Les huiles essentielles.....	4
I.1. Historique.....	4
I.2. Définition.....	5
I.3. Répartition des huiles essentielles.....	7
I.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	8
I.5. Localisation et origine des huiles essentielles.....	8
I.6. Fonction.....	9
I.7. Chimie et voie métabolique de synthèse.....	9
I.8. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles.....	13
I.8.1. Composition chimique d'une huile essentielle.....	14
I.8.1.1. Composés terpéniques.....	14
I.8.1.2. Composés aromatiques.....	18
I.8.1.3. Composés d'origine variée.....	19
I.8.2. Facteurs influençant la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles.....	20
I.8.2.1. Facteurs endogènes.....	20
I.8.2.2. Facteurs exogènes.....	21
I.9. Application des huiles essentielles.....	22
I.9.1. Secteur médecine.....	22
I.9.2. Secteur alimentation.....	23

TABLE DE MATIERE

I.9.3. Secteur parfumerie/ cosmétique.....	24
I.9.4. Secteur agronomie.....	25
I.10. Toxicité des huiles essentielles	26

Chapitre II. Procédés d'extraction et d'analyse des huiles essentielles

II .1. Procédés d'extraction des huiles essentielles et des molécules aromatiques.....	29
II.2. Choix de la méthode d'extraction.....	29
II.3. Mode d'extraction	32
II.3.1. Distillation	32
II.3.1.1. Distillation par entraînement à la vapeur.....	32
II.3.1.2. Hydrodistillation.....	34
II.3.1.3. Méthode d' hydrodiffusion.....	35
II.3.2. Turbo hydrodistillation.....	36
II.3.3. Expression à froid.....	37
II.3.4. Extraction des molécules aromatiques (concrètes et absolues)	37
II.3.4.1. Enfleurage.....	38
II.3.4.1.1. Enfleurage à froid	38
II.3.4.1. 2. Enfleurage à chaud	38
II.3.4.2. Extraction aux solvants.....	39
II.3.5. Extraction aux ultrasons	40
II.3.6. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	41
II.3.7. Extraction par le CO ₂	42
II.3.8. Détente instantanée contrôlée.....	44
II.4. Identification de la composition des huiles essentielles	44
II.4.1. Principe de fonctionnement de principales méthodes existantes.....	45
II.4.1.1. Chromatographie en phase gazeuse(CPG)....	45
II.4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	46

Chapitre III. Ciste à feuilles de sauge ; *Cistus salviifolius* L.

III.1. <i>Cistus salviifolius</i> L.....	48
III.1.1. Synonyme.....	48
III.1.2. Noms communs.....	48
III.1.3. Classification systématique.....	49
III.2. Aperçu de la famille des <i>Cistacées</i>	49
III.2.1. Genre <i>Cistus</i> L.....	50
III.3. Description botanique de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	51
III.4. Répartition géographique.....	52
III.5. Caractéristiques autoécologiques, biotope et phytosociologie.....	53
III.6. Propriétés, fonctions biologiques et usage.....	55
III.7. Etude chimique de <i>C salviifolius</i> L ainsi que quelques espèces de <i>Cistaceae</i>	56
III.8. Huile essentielles de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	59
III .9. Toxicité.....	61

Chapitre IV. *Activité antibactérienne des huiles essentielles*

IV. Généralités.....	62
IV.1. Infections bactériennes.....	62
IV.1.1. Toxi-infections alimentaires.....	62
IV.1.2. Infection nosocomiale.....	63
IV.2. Modes de transmission.....	64
IV.2.1. Transmission par contact direct ou infections endogènes.....	64
IV.2.2. Transmission par contact indirect ou infections exogènes.....	64
IV.3. Antibiotiques.....	64
IV.3.1. Définition.....	64
IV.3.2. Antibiotiques naturels et synthétiques et leur mode d'action.....	65
IV.4. Antibiorésistance.....	68
IV.4.1. Résistance naturelle.....	69
IV.4.2. Résistance acquise.....	69
IV.5. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens.....	70

Partie expérimentale

Chapitre V. Matériel et Méthodes

V.1. Présentation de la zone d'étude (Parc national de Theniet El Had).....	74
V.1.1. Situation géographique	74
V.1.2. Caractéristiques climatiques	74
V.2. Matériel végétal	76
V.2.1. Récolte	76
V.3. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles de <i>Cistus salviifolius</i> L	78
V.3.1. Extraction par hydrodistillation	78
V.3.1.1. Matériel végétal	78
V.3.1.2. Calcul du rendement	79
V.4. Méthodes d'étude de l'effet de séchage.....	80
V.5. Caractérisation chimique des HEs de <i>Cistus salviifolius</i> L	80
V.5.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	81
V.5. 2. Identification des composés chimiques	82
V.6. Procédés d'étude microbiologique.....	82
V.6.1. Souches microbiennes testées.....	82
V.6.2. Principales caractères des souches testées	83
V.6.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	83
V.6.2.2. <i>Bacillus cereus</i>	83
V.6.2.3. <i>Bacillus subtilis</i>	84
V.6.2.4. <i>Escherichia coli</i>	84
V.6.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
V.6.2.6. <i>Salmonella enterica</i>	85
V.7. Milieux de culture utilisés	86
V.7.1. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)	86
V.8. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (Antibiogramme).....	87
V.8.1 Principe	87

TABLE DE MATIERE

V.9. Etude du comportement des souches bactérienne vis-à-vis les principes actifs	90
V.9.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme	90
V.9.1.1. Principe	90
V.9.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	91

Chapitre VI. Résultats et discussion

VI.1. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles de <i>Cistus salviifolius</i> L.	94
VI.1.1. Extraction des huiles essentielles	94
VI.1.1.1. Rendement d'extraction	94
VI.1.1.2. Effet du période de séchage sur le rendement des huiles essentielles	96
VI.1.2. Détermination de la composition chimique de l'HE de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	98
VI.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	102
VI.2.1. L'Antibiogramme.....	102
VI.2.2. L'aromatogramme.....	104
VI.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	107
Conclusion générale	110
Références bibliographiques	117
Annexes	156

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Collection Culture

CMI: concentration minimale inhibitrice

DL50 : Dose Létale 50

DMSO: Diméthyl sulfoxide

DO: densité optique

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GC/MS: Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

HE: huiles essentielle

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

Ir: Indice de rétention

IR: Infrarouge

L.: Linné

m/z : Masse sur charge

McF: McFarland

MH: milieu de Mueller Hinton

MM: masse molaire

OMS: Organisation mondiale de la santé

PNTEH: Parc National de Theniet El-Had

RMN: résonance magnétique nucléaire

SM: spectrométrie de masse

UV-B: ultraviolet

v/v: Volume /Volume

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification des terpénoïdes.....	16
Tableau II.1: Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction	31
Tableau III.1: Classification systématique du <i>C salviifolius</i> L.....	49
Tableau IV.1 : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques	67
Tableau V.1: Fiche technique du site d'échantillonnage.....	78
Tableau V.2 : Liste des souches microbiennes testées	82
Tableau V.3: Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	89
Tableau V.4: Concentrations finales des huiles essentielles de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	92
Tableau VI.1: Propriétés organoleptiques de l'HE de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	94
Tableau VI.2: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	99
Tableau VI.3 : Résultats de l'antibiogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm).....	103
Tableau VI.4: Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle de <i>Cistus salviifolius</i> L. vis-à-vis les bactéries testées	105
Tableau VI.5: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de <i>Cistus salviifolius</i> L. vis-à-vis les six bactéries testées.....	108

Liste des figures

Figure I.1. Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes...	7
Figure I.2. Les unités de construction de base des terpènes et des phénylpropènes	11
Figure I.3. Un aperçu des voies responsables de la synthèse des terpènes et des phénylpropènes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles végétales	12
Figure I.4. Structure de l'isoprène (C ₅ H ₈)	15
Figure I.5. Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des HEs	17
Figure I.6. Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des HEs	18
Figure I.7. Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des HEs	19
Figure II.1. Principales opérations industrielles d'extraction	30
Figure II.2. Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau	33
Figure II.3. Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	35
Figure II.4. Schéma du procédé d'hydrodiffusion	36
Figure II.5. Extraction par turbo hydrodistillation	36
Figure II.6. Extraction par expression à froid	37
Figure II.7. Extraction aux ultrasons: bac et sonde	41
Figure II.8. Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes	42
Figure II.9. Schéma du procédé de l'extraction par CO ₂ supercritique	43
Figure II.10. Extraction par détente instantanée contrôlée	44
Figure II.11. Schéma descriptif d'une Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	46
Figure II.12. Schéma d'un système GC-MS	47
Figure III.1. <i>Cistus salviifolius</i> L	48
Figure III.2. Description botanique de <i>Cistus salviifolius</i> L	51
Figure III.3. Carte de distribution du <i>Cistus salviifolius</i> en Europe du Sud et en Méditerranée.....	52
Figure III.4. Répartition géographique de <i>Cistus salviifolius</i> L en Algérie et spécialement dans le parc national de Theniet El had	53
Figure III.5. Conditions écologiques de <i>Cistus salviifolius</i>	54
Figure III.6. Structures des di terpènes de type labdane	60
Figure IV.1. Les différents modes d'action des antibiotiques sur les cellules microbiennes	66

Liste des figures

Figure IV.2. Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	70
Figure IV.3. Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs.....	72
Figure V.1. Situation géographique du parc national de Theniet El Had	75
Figure V.2. Carte des cantons - Parc national de Theniet El Had.....	76
Figure V.3. <i>Cistus salviifolius</i> . de Theniet Elhad, Tissemsilt, Algérie	77
Figure V.4. Dispositif d'hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle	79
Figure V.5. Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger)	80
Figure V.6. Chromatographe en phase gazeuse 7890A. (Agilent, américain) équipé d'un spectromètre de masse 5975C Plus (Agilent, américain)	81
Figure V.7. Préparation de l'inoculum	87
Figure V.8. Dépôt des disques.....	88
Figure V.9. Incubation 24H à 37°C	88
Figure V.10. Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.....	91
Figure V.11. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	93
Figure VI.1. Variation du rendement des huiles essentielles de la plante <i>Cistus salviifolius</i> L au cours des jours de séchage	96
Figure VI.2. Proportions des différents groupes chimiques de l'huile essentielle de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	100
Figure VI.3. Structure chimique des composants majoritaire de l'HE de <i>Cistus salviifolius</i> L .	101
Figure VI.4. Aromatogramme de l'ensemble des bactéries par l'huile essentielle de <i>Cistus salviifolius</i> L.....	106

Introduction

Introduction

Les plantes ont été la principale source de remède pour de nombreuses maladies ayant affecté l'humanité tout au long de son histoire pendant des **milliers** d'années; contrairement aux médicaments traditionnels, les plantes médicinales se comportent avec douceur et offrent rarement des effets secondaires, elles sont d'une grande importance pour la santé de la population (**Edeoga et al., 2005**).

En général, la région méditerranéenne et l'Algérie en particulier, se distingue par sa diversité florale, dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes: on y trouve plus de 3000 espèces végétales.

Certains chercheurs suggèrent que les deux tiers des espèces végétales du monde ont une valeur médicinale (**Duduku et al., 2011**). Ces plantes médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines tels que : l'industrie alimentaire, pharmaceutique et phytothérapie (**Duraffourd et al., 1990**).

La valorisation de ces ressources est devenue indispensable. A cet égard nous sommes intéressés à une espèce poussant à l'état sauvage au nord-ouest du pays, à savoir, *Cistus salviifolius* L. et plus particulièrement, à leur métabolites secondaires dont les huiles essentielles.

De nos jours, la tendance à l'utilisation des produits naturels issus des plantes est en pleine croissance face au souci des effets secondaires des composés synthétiques qui peuvent être nocifs à la santé humaine et à l'environnement.

A ce titre, les huiles essentielles et les arômes constituent la majeure partie des composés aromatiques naturels qui aujourd'hui sont de plus en plus utilisés dans différents secteurs.

Ces HEs peuvent être extraites de différentes parties de plantes; les feuilles, les écorces, les fleurs, les bourgeons, les graines, etc. (**Tongnuanchan et Benjakul., 2014**). Il existe au moins 150 types d'huiles essentielles commercialisées sur le marché international (**Kusuma et Mahfud., 2017**).

Elles sont obtenues par différentes méthodes d'extraction essentiellement par distillation et ou extraction aux solvants cependant le rendement en huile essentielle peut être affecté par plusieurs facteurs notamment par la durée de séchage de la plante fraîche avant sa mise en distillation et qui demeure un facteur non maîtrisée pour les producteurs (**Asekun et al., 2007 ; Shahpour et Ayotollah., 2008 ; Mastino et al., 2017**).

En outre ces HEs sont dotées d'un large éventail d'activités biologiques (antioxydante, antifongique, antimicrobienne) (Mantle *et al.*, 1998 ; Lis-Balchin., 2002 ; Shin *et al.*, 2005 ; Karioti *et al.*, 2006).

Le genre *Cistus* comprend plusieurs plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs pathologies y compris le diabète hyperglycémiant (Polat *et al.*, 2012).

Dans la médecine populaire méditerranéenne, toutes les espèces de cistes sont fréquemment utilisées en infusion pour le traitement de diverses maladies de la peau, des rhumatismes, de la fièvre et de la diarrhée (Lendeckel *et al.*, 2002 ; Attaguile., 2004).

La plupart des études sur la fraction volatile de *Cistus* spp. portent sur l'huile essentielle obtenue soit par distillation à la vapeur (Oller-López *et al.*, 2005), soit par hydrodistillation (Demetzoset *et al.*, 2002 ; Paolini *et al.*, 2008 ; Greche *et al.*, 2009 ; Viuda-Martos *et al.*, 2011 ; Verdeguer *et al.*, 2012 ; Loizzo *et al.*, 2013 ; Bechlaghem *et al.*, 2020), ainsi que d'autres techniques d'extraction courantes impliquant l'utilisation de solvants tels que l'hexane (Ben Jemia *et al.*, 2013).

Cistus salviifolius L. (Ciste à feuilles de sauge), est un sou arbusseau méditerranéen très répandu dans la région méditerranéenne (Sayah *et al.*, 2017), appartient au sous-genre *Leucocistus*, est traditionnellement utilisé comme astringent et cicatrisant dans certains pays de la Méditerranée, en plus fréquemment utilisé comme substitut du thé (Quer., 2005), aussi il a été utilisé pour le traitement de la goutte (Al-Khalil., 1995)

Des études antérieures montrent l'efficacité de l'huile essentielle de *C salviifolius* contre les bactéries Gram positif testées vu que les staphylocoques étaient les plus sensibles, tandis que les bactéries Gram négatif étaient moins inhibées (Demetzos *et al.*, 2002).

Par ailleurs dans les HEs de *C. salviifolius* L. les composés non terpéniques sont dominants, en particulier les acides non terpéniques et leurs dérivés, ce qui offre une meilleure activité de l'HE contre les souches d'*Acinetobacter baumannii* (Olivera *et al.*, 2010).

D'autres travaux ont montré l'efficacité de l'extrait d'éthanol de *C salviifolius* poussant en Espagne contre *E. coli* et *S. aureus* (Tomás., 2013).

Aussi il a été démontré dans une étude menée au Maroc, qu'elles sont dotées d'une activité anti-mycobactérienne contre *Mycobacterium aurum* A+ et *Mycobacterium smegmatis* (Haouat *et al.*, 2013).

En outre, des études phytochimiques sur *C salviifolius* L. ont révélé leur capacité à produire de grandes quantités de métabolites naturels, principalement des composés flavonoïdes, des tanins et des terpénoïdes (Papaefthimiou *et al.*, 2014) qui sont connus pour avoir de nombreux avantages pour la santé.

Malgré son importance, les recherches sur la composition chimique ainsi que l'effet antibactérien des huiles essentielles de *C salviifolius* L sont peu abondantes en Algérie. Pour cela et dans le cadre de cette étude, nous essayerons d'apporter des éléments de connaissances chimiques approfondis relatifs à cette espèce par l'identification de la composition chimique des huiles essentielles de *C salviifolius* L. récoltée dans la région de Theniet El had (Tissemsilt), ainsi que leur effet antibactérien à l'encontre de certaines espèces. En outre, l'évaluation de l'effet de la période de séchage sur le rendement en huiles essentielles afin d'optimiser ce paramètre a été également abordée à ce titre, on lance comme problématique Est-ce que les composants en HEs de *C salviifolius* L, justifient leur utilisation dans la médecine traditionnelle ? Dans quelle mesure le séchage de la plante peut influencer sur le rendement en HEs ? Et ces HEs de cette espèce sont-elles capables de faire face au phénomène d'antibiorésistance ?

Le présent travail est structuré en deux parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur quatre chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les huiles essentielles, les méthodes d'extraction et d'analyses des HEs sont présentées dans le deuxième chapitre.

Le troisième et le quatrième chapitre s'intéressent à la description botanique de l'espèce végétale étudiée et à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles respectivement.

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres, le premier (cinquième chapitre) présente le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail, à savoir:

- Extraction des huiles essentielles du *C salviifolius* L. par hydrodistillation
- Analyse et identification de la composition chimique des huiles essentielles par CPG-SM ;
- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la méthode de l'aromatogramme ;

Le second (sixième chapitre) est consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Chapitre I :

Généralités sur les huiles essentielles

I. Les huiles essentielles

I.1. Historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales "P.A.M" est liée à l'évolution des civilisations. L'histoire des peuples témoigne que ces plantes ont toujours eu une importance en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'année 3000 AV. J-C. (**Başer., 2015**).

Il semble donc que les huiles essentielles aient accompagné la civilisation humaine dès ses débuts.

Les grands berceaux géographiques de la civilisation aromatique sont l'Inde, la Chine et le bassin méditerranéen. Ces berceaux ont apporté à l'humanité des acquis dans le domaine des huiles essentielles, dont la validité est encore valable aujourd'hui.

En 1931, dans son livre "Aromathérapie", Gattefosse décrit ses expériences et ses découvertes, il est le premier à mettre en évidence les relations entre la structure et l'activité des molécules aromatiques et de déterminer les grandes propriétés des arômes naturels comme antitoxiques, antiseptiques, tonifiants, stimulants, calmants, etc. (**Bardeau., 1976**).

A cette époque il a prédit que les huiles essentielles réservent un rôle important dans cette thérapie à l'avenir ; c'est bien ce que l'on constate aujourd'hui.

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur ; il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide (**Bousiba., 2011**).

Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation. Il était certainement connu des Chinois et des Indiens depuis 20 siècles avant J.C. Les Egyptiens et les Arabes ont prévalu des caractéristiques médicinales et aromatiques des plantes: la conservation des momies, l'aromatisation des bains, la désinfection des plaies avec les onguents, les parfums et la fabrication des boissons aromatiques (**Möller., 2008**).

A l'apogée de leurs conquêtes en Afrique du Nord et en Espagne, les arabes le firent connaître aux Espagnols, lesquels à leur tour le propagèrent en Europe, à travers les possessions du Royaume d'Aragon, échelonnées tout le long des Côtes du Nord de la Méditerranée (**Berthier., 1980 ; Möller., 2008**).

Comme le montre **Ntezurubanza (2000)**, l'histoire de l'aromathérapie, qui est celle des huiles essentielles, peut se résumer aux quatre époques suivantes:

- L'époque au cours de laquelle étaient utilisées des plantes aromatiques telles qu'elles ou sous forme d'infusion ou de décoctions.
- Ensuite l'époque dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale. A cette époque, intervient la notion d'activité liée à la substance odorante
- La troisième correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Il apparaît le concept "Huile essentielle" qui aboutit à la création et au développement de la distillation.
- En fin, la dernière qui est la période moderne dans laquelle les connaissances des composants des huiles essentielles interviennent et expliquent les effets physiques, chimiques, biochimiques, et physiologiques.

Enfin la valeur médicinale des plantes est de plus en plus prouvée scientifiquement ; c'est ce qui constitue d'ailleurs un argument de taille pour leur usage en médecine.

I.2. Définition

Il existe plusieurs définitions d'une huile essentielle qui se rapprochent du fait qu'une huile essentielle est décrite en tant que produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, suite à des procédés physiques qui le séparent de la phase aqueuse.

Les huiles essentielles sont, pour la plupart, générées par l'organisme végétale (**Charabot et al., 1899**); mais il en existe (comme les essences d'amandes et de moutarde) qui n'apparaissent que lorsque les parties de la plante sont amenées en contact avec l'eau (**Durville., 1930**).

Pour **Naves (1976)**, aucune des définitions d'HE n'a le mérite d'être claire, ni précise. Les HEs sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau.

Cette définition peut être étendue aux HEs obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

Les arômes sont des molécules organiques de faible masse moléculaire, avec une tension de vapeur élevée pour que ces molécules puissent provoquer un stimulus au contact de la muqueuse olfactive (**Richard., 1992**). Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie; l'aromathérapie (**Cimanga et al., 2002**).

Burt., (2004) a décrit les huiles essentielles en tant que des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits. Elles ont des applications importantes en médecine soit par leur qualité odorante soit pour soulager la douleur ou pour leur efficacité physiologique (**Valnet., 2003**).

La nouvelle Encyclopédie **Funk et Wagnalls, (2004)** décrit les huiles essentielles comme des liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau. Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique.

D'après **Meierhenrich et al., (2005)**, ces aromes sont formés de dizaine de composés odorants, ayant une polarité faible, une certaine solubilité dans l'eau et un caractère lipophile élevé.

La distinction entre les huiles essentielles et les essences est très importante. Cette dernière est une sécrétion naturelle produite par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, qui varient selon la partie de la plante considérée. Une huile essentielle, par contre, est le résultat de l'extraction de l'essence, c'est-à-dire de l'essence distillée (**Carette., 2000**). Et contrairement à ce que le terme pourrait suggérer, l'huile essentielle ne contient pas de substances grasses comme l'huile végétale (**Anton et Lobstein., 2005**).

Le mot huile est attribué à son caractère hydrophobe et à ses propriétés de solubilisation dans les graisses, alors que le mot essentiel reflète l'odeur distinctive dégagée par la plante productrice (**Talbaoui et al., 2012**)

I.3. Répartition des huiles essentielles

Les huiles essentielles se retrouvent dans tout le règne végétal. Cependant, leur abondance est particulièrement élevée dans certaines familles: *Conifères*, *Rutacées*, *Ombellifères*, *Myrtacées*, *Lamiacées*, *Poaceae*. (Mann., 1987).

Au contraire, Bruneton., (1999) et Degryse *et al.*, (2008) ont indiqué que les huiles essentielles ne sont pas présentes en général dans les plantes et parmi les 1.500.000 espèces de plantes identifiées, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont alors appelées "aromatiques".

Les mêmes constatations sont rapportées par Samate., (2002) et Chouitah., (2012) lorsqu'ils affirment que les huiles essentielles n'existent pratiquement que dans les plantes supérieures et que les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis en une cinquantaine de familles dont beaucoup appartiennent aux ordres des *Lamiales*, des *Astérides*, des *Rutales*, des *Laurales*... des *Magnoliales*...

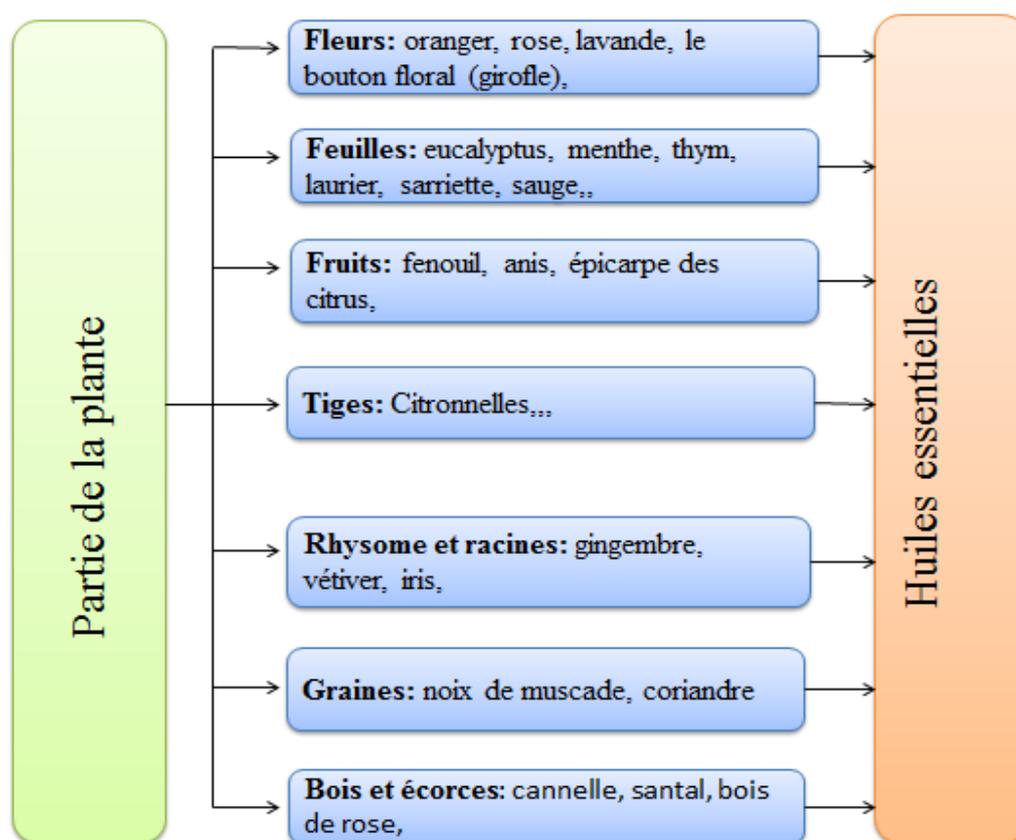


Figure I.1: Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes. (Benchikh., 2017)

I.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Les plantes utilisent les HEs pour se protéger contre les virus et tous pensent qu'il s'agit d'hormones végétales. D'autres considèrent que les huiles sont des messagers entre sorte de parasites et de microbes (**Willem., 2009**).

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, des travaux ont montré que les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent jouer des rôles importants dans la relation des plantes avec leur environnement.

Elles jouent plusieurs rôles écologiques :

- Interaction plante-plante (inhibition de la germination et de la croissance) par exemple, le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes (**Holley., 1999 ; Nicholas., 1973**).
- Interaction plante animale, pour leur protection contre les prédateurs. (**Fouché *et al.*, 2008**).

I.5. Localisation et origine des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs comme dans la menthe), canaux sécréteurs et ont vraisemblablement un rôle défensif: protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores.

La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les labiateae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les asteraceae (camomille, absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les lauraceae (cannelle, laurier).

Beaucoup de végétaux contiennent des huiles essentielles ou des substances voisines mais en pratique peu d'espèces sont utilisées (**Hurtel., 2006**).

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de cellules sécrétrices variables selon l'organe végétal considéré. Puis, elles s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées et emmagasinées dans des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, à savoir, des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* et *Zingiberaceae*), des poils glandulaires épidermiques qui produisent les essences dites superficielles (*Labiaceae*, *Geraniaceae* et *Rutaceae*), des poches sécrétrices (*Myrtaceae*, *Aurantiaceae*, *Rutaceae*) ou encore des canaux sécréteurs (*Apiaceae*, *Ombelliferaeae* et *Asteraceae*) (Bruneton., 1999 ; Boz et al., 2009).

Selon Couic et al (2013), ces huiles essentielles sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches.

I.6. Fonction

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure. Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont un rôle écologique. A l'appui de cette hypothèse, on remarquera que le rôle de certains d'entre eux a été établi expérimentalement aussi bien dans le domaine des interactions végétales comme agents idiopathiques, notamment inhibiteurs de germination, que dans celui des interaction végétales-animales contre les insectes et les champignons (Bruneton., 2008).

I.7. Chimie et voie métabolique de synthèse

Les huiles essentielles sont généralement composées de métabolites secondaires de terpène et de phénylpropène. En général, les composés d'une classe domine. Par exemple, l'huile essentielle de girofle (*Syzygium aromaticum*) est composée principalement de phénylpropènes (Dewick., 2002), alors que l'origan (*Oreganum vulgare*) est composé principalement de terpènes (Vokou et al., 1993).

Les isoprènes (C5), le diphosphate d'isopentényle et le diphosphate de diméthylallyle sont les éléments constitutifs de base des terpènes (Fig.I.2).

Chez les plantes, elles sont synthétisées en utilisant l'acétyl-CoA (voie du mévalonate), intermédiaire du cycle de l'acide citrique, et les glycolytiques intermédiaires glyceraldéhyde 3-phosphate et pyruvate (voie de désoxyxylulose) comme précurseurs (**Dewick., 2002**). La condensation du diphosphate d'isopentényle et du diphosphate de diméthylallyle produit le monoterpène (C10) géranyl diphosphate, à partir duquel le diphosphate de linalyle et le diphosphate de néryle sont formés par des réactions d'isomérisation. À partir de ces trois monoterpènes, une gamme de monoterpènes linéaires et cycliques sont formés (par exemple, limonène, thymol, carvacrol, linalool, carvone, acétate de géranyle). Les sesquiterpènes (C15), plus grands et moins volatils, sont formés par addition de diphosphate d'isopentényle à le diphosphate de géranyle, qui donne le diphosphate de farnésyle, le précurseur d'autres sesquiterpènes, dont la zingérbérine et l'artémisinine.

Les phénylpropènes sont synthétisés par la voie du shikimate (**Fig.I.3**), qui est utilisée par les plantes et les microorganismes (**Sangwan et al., 2001**) pour synthétiser les acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine. La désamination de la phénylalanine donne l'acide cinnamique, l'unité de construction phénylpropyle de base (c'est-à-dire un cycle aromatique 6C auquel est attachée une chaîne 3C; qui, sur hydroxylation, donne de l'acide 4-coumarique. On pense que c'est la voie la plus courante par laquelle l'acide 4-coumarique est synthétisé (**Dewick., 2002**), mais elle peut également être formée par la désamination de la tyrosine. De l'acide 4-coumarique, via une série de réactions,

Les phénylpropènes sont synthétisés (par exemple, cinnamaldéhyde, eugénol, anéthole, myristicine et safrole. (**Fig.I.3**).

Si les terpènes et les phénylpropènes dominent la composition des huiles essentielles, ils ne sont pas les seuls types de composés dans les huiles essentielles. Par exemple, l'huile essentielle d'ail contient une série de composés organo-soufrés (par exemple, le sulfure de diallyle (DAS), disulfure de diallyle (DADS), trisulfure de diallyle (DATS), vinyl-dithiines et adjoènes (**Corzo-Martínez et al., 2007**). Ces dipeptides sont hydrolysés et oxydés en sulfoxydes de cystéine ; alliine, isoalliine et méthionine (**Jones et al., 2004**).

L'alliine est le principal sulfoxyde de cystéine de l'ail. Lors de la transformation (c'est-à-dire le broyage et la coupe), les cystéine sulfoxydes sont rapidement clivés par l'enzyme alliinase pour donner des thiosulfonates (par exemple, l'allicine), le pyruvate et l'ammoniac (**Amagase *et al.*, 2001**). Les thiosulfonates sont instables et se décomposent rapidement en sulfures, qui sont abondantes dans l'huile essentielle d'ail.

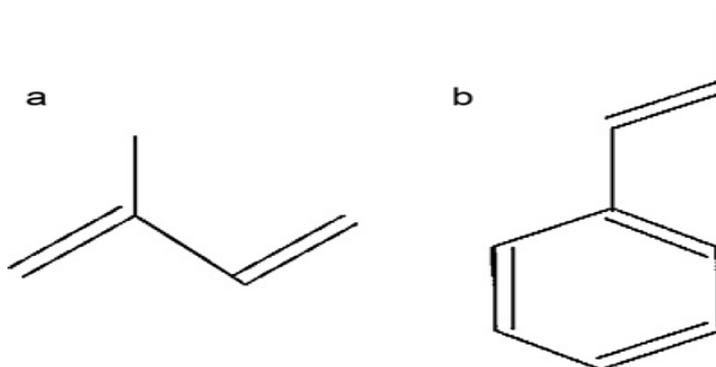


Figure I.2: Les unités de construction de base des terpènes et des phénylpropènes, l'unité d'isoprène C5 (a) et l'unité de phénylpropyle C6C3 (b), respectivement (**Benchaar *et al.*, 2011**)

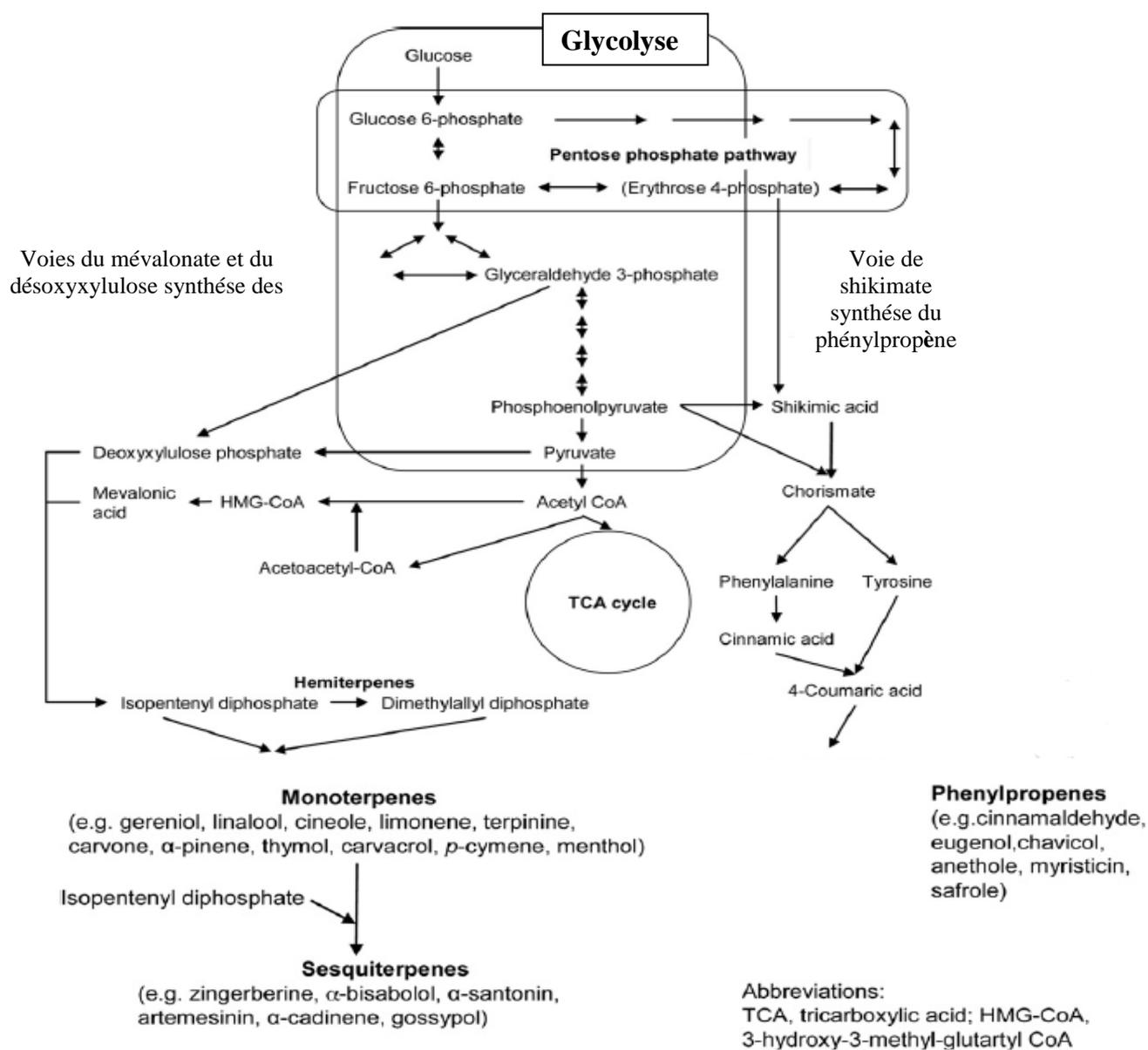


Figure I.3: Un aperçu des voies responsables de la synthèse des terpènes et des phénylpropènes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles végétales (Benchaar *et al.*, 2011)

I.8. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (Afssaps., 2008). Il existe toutefois des exceptions comme par exemple l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* L.) et l'huile essentielle de clous de girofle (*Syzygium aromaticum* L.). Plus la différence de densité entre l'eau et l'huile essentielle sera importante plus il sera simple de les séparer au niveau de l'essencier (Perillaud., 2018).

Un indice de réfraction élevé caractérise ces huiles essentielles qui sont pour la plupart colorées : ex: rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclérée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée (Couic-Marinier., 2013).

Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (Afssaps., 2008).

Les huiles essentielles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, elles peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol...etc) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (Bernadet., 2000).

La nouvelle Encyclopédie Funk et Wagnalls., (2004) décrit les huiles essentielles comme les « liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau. Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique :

- a) Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron;
- b) Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo;
- c) Les esters, tel que le salicylate de méthyle dans l'huile de wintergreen;
- d) Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères;
- e) Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée;
- f) Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka.

I.8.1. Composition chimique d'une huile essentielle

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'un même genre botanique, ces variations peuvent s'observer au sein d'une même espèce. Elle dépend en fait de différents paramètres extrinsèques (le sol, l'environnement, le climat), intrinsèques (le degré de maturité, les facteurs génétiques, la localisation), technologiques (le type de culture, le mode de récolte), ainsi que les modes d'extraction. Les huiles essentielles et les arômes sont issus du métabolisme secondaire de la plante et peuvent être stockés dans diverses structures telles que les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poils sécréteurs ou les trichomes (Caissard et Baudino., 2012).

Elles sont des mélanges complexes de substances volatiles constituées d'environ de 20 à 60 composés à des concentrations différentes et qui se caractérisent essentiellement par leurs poids moléculaires faibles, au-dessous de 300 Daltons, et par leur hydrophobicité (Sell., 2010).

Ces constituants appartiennent, de façon presque exclusivement, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (Fig.I.4) (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) d'une part (Bruneton., 1999 ; Croteau *et al.*, 2000 ; Seguin., 2001; Rhayour., 2002; Bowles., 2003; Chami., 2005; Clarke., 2008; Baser et Buchbauer., 2010) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquents d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

I.8.1.1. Les composés terpéniques

Il représente une famille de composés grandement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) (Fig.I.4) (Lamarti *et al.*, 1994). Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka in Lamarti *et al.* (1994). Selon cette règle, le diphosphate l'isopentényle (IPP), connu sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule de terpène.

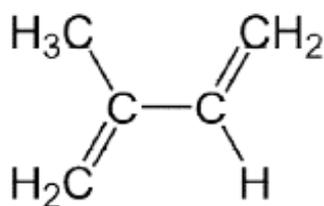
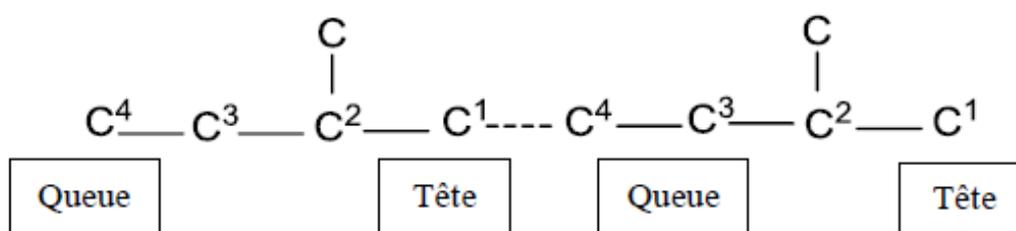


Figure I.4: Structure de l'isoprène (C₅H₈) (Lakhdar., 2015)

Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (Lamarti *et al.*, 1994).



Les dérivés oxygénés des terpènes s'appellent terpénoïdes. Une grande variété de structures caractérisent les terpénoïdes selon le nombre de carbones présents, le caractère saturé ou insaturé des liaisons, la configuration spatiale (forme de chaise, bateau..) et la nature du groupe fonctionnel. Ces terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (Bakkali *et al.*, 2008).

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprènes dans leur structure de base dans le **Tableau I.1.**

Tableau I.1: Classification des terpénoïdes (Touhami., 2017)

Classe	Formule brute	Nombre d'isoprène	Exemples
Hémiterpènes	C ₅ H ₈	1	Isoprène
Monoterpènes	C ₁₀ H ₁₆	2	Linalool, limonène, citronelle
Sesquiterpènes	C ₁₅ H ₂₄	3	β-Cadinène, αFarnisène
Diterpènes	C ₂₀ H ₃₂	4	Sclaréol, kaurène
Triterpènes	C ₃₀ H ₄₈	6	Sclaréol, α-amyrine
Polyterpènes	(C ₅ H ₈) _n	45-30000	Polyisoprène (élastomère)

Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles et beaucoup plus rarement, les diterpénoïdes (Bruneton., 1999 ; Couic-Marinier et Lobstein., 2013) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (Pibiri., 2006).

- **Les monoterpènes**

Les monoterpènes sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90% (Bruneton., 2008).

Ils contiennent plus de 900 composés connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales: les monoterpènes linéaires (acyclique): (myrcène, ocimènes), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) : (α- et γ-terpinène, p-cymène) et ceux avec deux cycles (bicycliques) : (pinènes, Δ₃-carène, camphène, sabinène). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen *et al.*, 1977). D'après Bruneton (1999), la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

Les monoterpénols possèdent des propriétés anti-infectieuses mises en évidence *in vitro* sur différents types d'agents infectieux. En outre ils agissent notamment sur les bactéries en perturbant l'activité membranaire de ces dernières (Kaloustian., 2012).

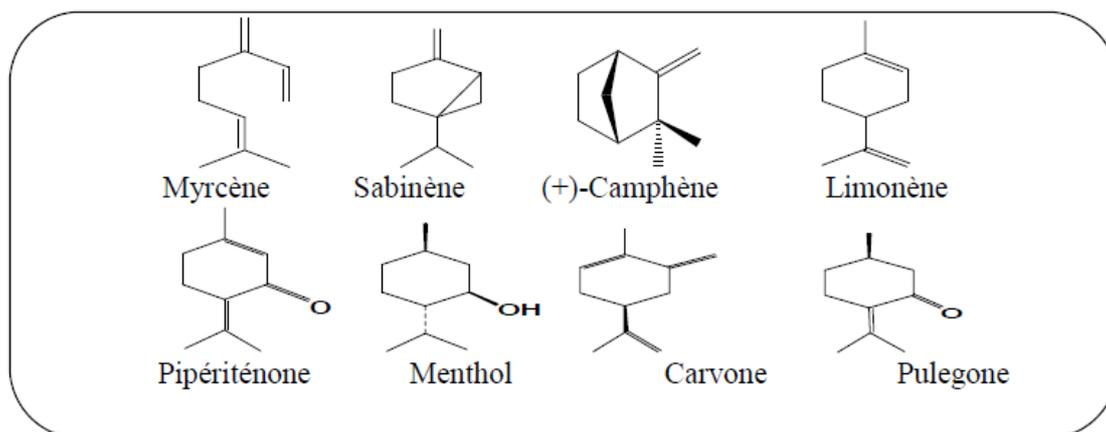


Figure I.5: Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des HEs.
(Fekih., 2014)

- **Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (Belaiche., 1979).

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus, de 3000 molécules, ils peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (Bruneton., 1999; Laouer., 2004).

D'après Kaloustian., (2012), un des molécules sesquiterpéniques possède des propriétés antibactériennes mises en évidence *in vitro* ainsi que des propriétés anti-inflammatoires chez le rat par inhibition de la synthèse des médiateurs de l'inflammation.

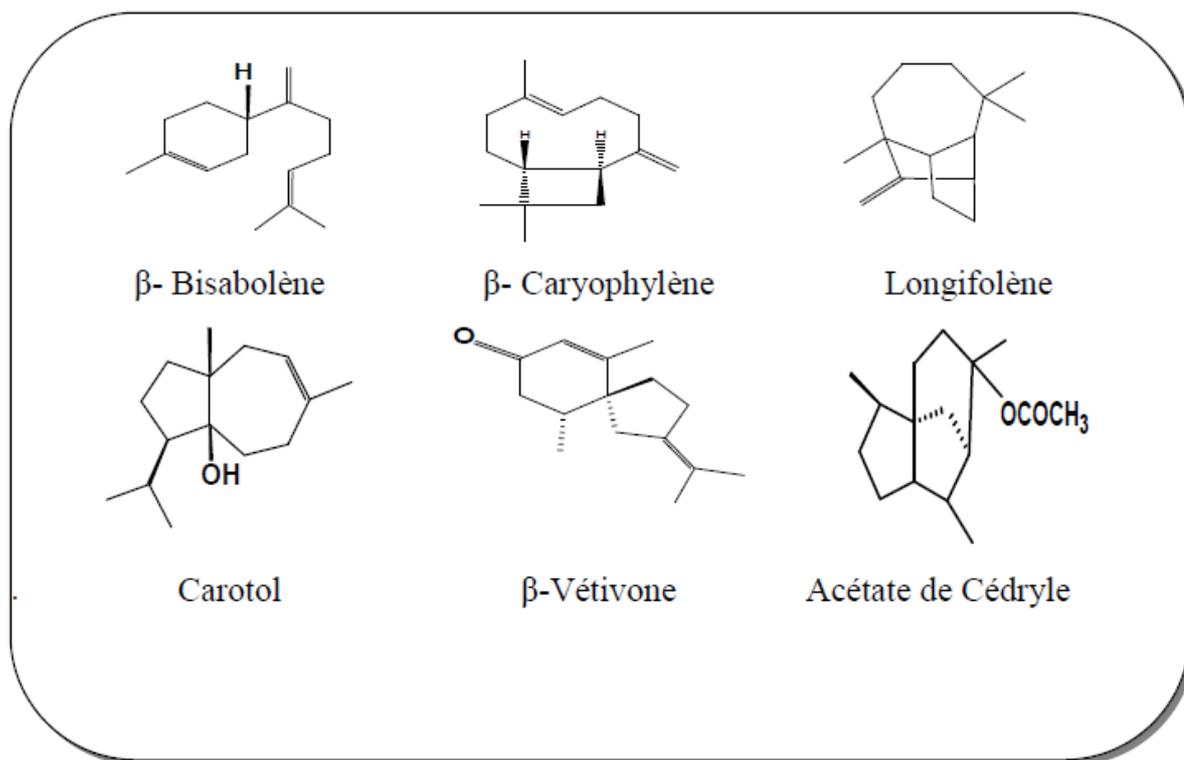


Figure I.6: Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des HEs.
(Fekih., 2014)

I.8.1.2. Les composés aromatiques

A l'opposition aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins abondants dans les huiles essentielles. Ces composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C₆-C₃. Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Ils peuvent comprendre des phénols (chavicol, eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrole) (Bakkali *et al.*, 2008). La structure des différentes molécules est présente dans la **Figure I.7**.

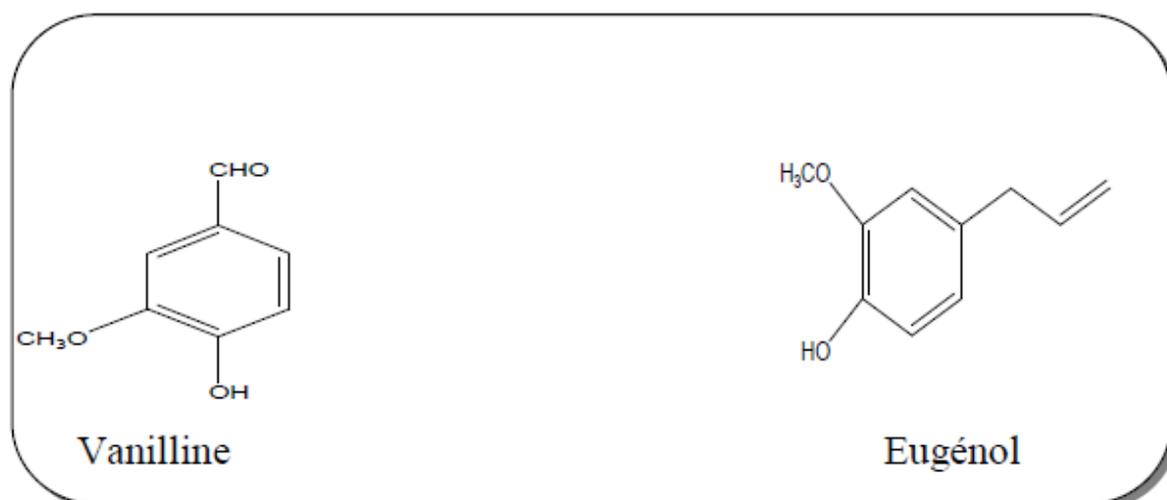


Figure I.7: Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des HEs.
(Fekih., 2014)

I.8.1.3. Composés d'origine variée

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés).

Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînables par la vapeur d'eau (Bruneton., 1999).

Le chémotype d'une HE est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle.

Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle.

A titre d'exemple, le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol de 57% tandis que la même plante cultivé à l'abri de la lumière en contient 74% (Franchomme et Denoël., 1990), cette variabilité peut être affecté également par la composition du sol et la position géographique, le lippiamutiflora au Togo a révélé les chémotypes à citral, à thymol (acétate de thymyle), à para-cymene, à 1-8 cinéole (Inouye et Abe., 2003).

Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Romarin officinalis*, et *l'eucalyptus* (Zhiri et boudoux., 2005).

I.8.2. Facteurs influençant la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes. Le mot chémotype est dérivé de chimiotype ou chimiovariété (Fekih., 2014). Cette variation peut être due à des nombreux facteurs, dont nous les regroupons en deux types:

I.8.2.1. Les facteurs endogènes

Les facteurs endogènes sont liés au site de production et d'accumulation des HEs dans l'usine, l'âge de la plante et les caractéristiques génétiques qui régulent le métabolisme secondaire.

L'environnement pourrait également affecter l'ADN des plantes aromatiques allant des chémotypes aux différents génotypes.

Peu d'études ont signalé l'influence du facteur endogène, la partie de la plante utilisée pour obtenir des HEs doit être considérée comme un facteur endogène car elle est liée aux caractéristiques anatomiques et physiologiques des plantes. Par exemple, chez les Lamiacées, les HEs sont situées dans les parties aériennes des plantes, mais chez le genre *Citrus* des Rutacées, les HEs sont situées dans les pelures et les feuilles. En outre, l'emplacement et la nature des structures de sécrétion varient d'une espèce à autre (Barra., 2009).

Peu d'études ont signalé l'influence du facteur endogène "âge des plantes" sur la composition chimique des HE. L'HE obtenue à partir de plantes de deux ans de *Thymus vulgaris* L., était plus riche en thymol que l'HE obtenue à partir de plantes de cinq ans dans le même cycle végétatif (Hudaib., 2002). Les principales différences entre les HE des plantes de quatre ans et de onze ans d' *Eucalyptus camaldulensis* ont également été signalés (Pagoula., 2000).

Afolajan (2008), a indiqué la variation dans la composition chimique des tissus végétaux "nouveaux" par rapport aux "anciens", McConkey (2000), a rapporté que, dans les feuilles de menthe poivrée, la teneur en monoterpènes augmente rapidement entre 12 et 20 jours, puis se stabilise en pleine expansion et reste ensuite stable pour le reste de la période de vie des feuilles.

Aussi, un des facteurs endogènes les plus importants est celui de polymorphisme chimique

«variétés chimiques ou formes physiologiques ». Il est mis en évidence lorsque les mêmes espèces cultivées au même endroit peuvent avoir des compositions chimiques différentes : ce sont des chémotypes. Ce phénomène de variabilité chimique a été observé chez plusieurs espèces telles que *Melaleuca quinquenervia*, ce qui permet la possibilité d'une sélection de la biodiversité (**Razafindrakoto., 1988 ; Ramanoelina et al., 1992 ; Dethier., 1996**).

I.8.2.2. Les facteurs exogènes

Les facteurs exogènes, tels que la lumière, les précipitations, le site de culture (altitude, latitude) et la nature du sol (pH, constituants) sont généralement liés à l'environnement.

Lumière, précipitations, site de culture et sol

La lumière est responsable de l'augmentation de la concentration de monoterpènes et de phénylpropanes dans *Ocimum basilicum L* (**Johnson., 1999**), et provoque une augmentation de la concentration de monoterpènes dans *Satureja douglasii Benth* (**Peer., 1998**). En général, ces résultats sont en accord avec l'observation que de nombreuses enzymes de métabolisme des voies secondaires sont dépendantes des UV-B (**Kun., 1984**).

La disponibilité de l'eau peut influencer le déroulement des voies secondaires, car les réactions biosynthétiques se produisent dans un milieu aqueux. On sait que les augmentations de la disponibilité de l'eau augmente la production de monoterpènes (**Palà-Paül., 2001 ; Taveira., 2003**).

Selon **Barra (2009)**, l'huile essentielle variait considérablement de plantes poussant à 200-900m et de celles qui s'étend de 0 à 100m.

Certains documents traitent de l'influence du calcaire et les sols siliceux sur la variation de la composition des HEs. Les HEs de *Thymus spinulosus* cultivées en sol calcaire ont été caractérisées par une forte teneur en monoterpènes, alors que les huiles des plantes cultivées en sol siliceux se caractérisaient par sesquiterpènes comme leurs principales composantes (**De Feo., 2003**).

D'autres facteurs tels que, les techniques sylvicoles (la densité de plantation, l'irrigation, les traitements phytosanitaires, l'utilisation d'engrais, les techniques de récolte..etc) (**Barry., 2001 ; Lahlou., 2004 ; Stefanini et al., 2006 ; Aprotosoiaie et al., 2010**).

Les parasites, les virus et les mauvaises herbes qui influent sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles (**Smallfield et al., 2001**).

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (**khajeh et al., 2004 et 2005 ; Viljoen et al., 2006 ; Sefidkon et al., 2007 ; Rout et al., 2007**). La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition (**Yayi et al., 2004**).

D'après **Fantino (1990)**, lors d'un stockage prolongé au congélateur, des pertes considérables d'huile essentielle peuvent être constatées

En tenant compte des conditions de stockage des huiles essentielles après leur extraction décrites par **Carette (2000)**, lorsqu'il a mentionné que les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention car avec le temps leurs propriétés tendent à décroître, en outre, il s'est révélé que le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier leur composition.

I.9. Application des huiles essentielles

Les plantes aromatiques donnent les huiles essentielles (HE), essences destinées à l'utilisation industrielle. Ces HEs ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits : elles sont destinées en effet à quatre grands secteurs industriels (**Grysole., 2004**).

I.9.1. Secteur médecine

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues pures en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge (**Grysole., 2004**).

De nombreux produits tels que les pommades, les crèmes et les gels à base d'huiles essentielles permettraient de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique étant donné la propriété de ces huiles à pénétrer aisément dans la peau (principalement due aux terpènes). Ces produits sont généralement destinés à soulager les entorses, les courbatures, les allergies articulaires ou musculaires (**Razafindrakoto., 1988 ; Dethier., 1996 ; Edris., 2007**).

Par conséquent, les huiles essentielles ont une variété d'applications et elles se trouvent employé pour:

Des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires ; des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques; et aussi des propriétés antioxydantes; un effet anesthésiant pour soigner les douleurs rhumatismales; action stimulante sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication ; action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif, relaxant et déstressant ; effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales (**Daniel., 2006; Hüsnü et al., 2010**). ainsi que pour leurs effets guérissant (**Teuscher et al., 2005**).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation des huiles essentielles peut diminuer les troubles menstruels, le stress post-partum ainsi que les troubles ménopausiques (**Lardry et Haberkorn., 2007**).

L'huile essentielle d'Immortelle est réputée comme étant particulièrement efficace contre les hématomes (**Zhiri., 2013**) ainsi que son utilisation dans la lutte contre les problèmes circulatoires (**Miles., 2013**).

En effet, les huiles essentielles ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries, et des levures (**Duarte et al., 2005**) et également des moisissures (**Koba et al., 2004**), de plus elles sont très efficaces sur les microorganismes résistants aux antibiotiques.

I.9.2. Secteur alimentation

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser et conférer le goût des denrées alimentaires, pour parfumer et colorer. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'huiles. Aussi, les fabricants d'aliments préparés les utilisent de plus en plus parce que le nombre de produits augmente et le consommateur recherche d'avantage les produits avec des ingrédients naturels. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. Elles ont aussi une place prépondérante dans les confiseries, les produits laitiers, les produits carnés, les produits de boulangerie mais également pour la nutrition animale (**Bruneton., 1999**), tout particulièrement en aviculture (**Alleman et al., 2013**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et

antioxydantes (**Conner., 1993 ; Hammer et al., 1999**). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (**Grysole., 2005**).

I.9.3. Secteur parfumerie/ cosmétique

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. L'Europe et les Etats-Unis ont développé des industries importantes qui démarquent par leur haut niveau d'exportation dans ce domaine. L'huile essentielle dérivée de plantes aromatiques a reçu une augmentation l'attention en tant que parfums ou ingrédients actifs alternatifs comparés aux odeurs synthétiques dans les industries de la parfumerie et des cosmétiques (**Viciolle., 2012 ; Suetsugu., 2013**).

L'utilisation des HEs commence à prendre son essor en tant que conservateur en raison de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit.

De plus, leurs caractéristiques olfactives en font des produits largement utilisés dans la formulation des produits. Toutefois, leur utilisation peut avoir des contre-indications : des concentrations plus élevées du pourcentage recommandé peuvent générer des odeurs très prononcées ou bien provoquer des réactions cutanées telles que des allergies. Le comité scientifique des produits de consommation contrôle leur utilisation puisque parmi les 26 substances classées comme allergènes, 17 se trouvent en HE (eugénol, linalol, cinnamaldéhyde, géraniol, citral, etc.) (**André et Bettenfeld., 2012**). La septième modification de la directive cosmétique impose leur étiquetage s'ils sont présents à plus de 0,0001% dans les produits rincés (savons, shampoings, etc.) et à plus de 0,01% dans les produits non rincés (crèmes, lotions) (**Afssaps., 2008**).

La consommation d'huiles dans ce domaine reste toujours d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés

Le domaine de la parfumerie technique (qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels) a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au

meilleur prix possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum.

I.9.4. Secteur agronomie

Les huiles essentielles et leurs constituants comme bioinsecticides

La lutte chimique contre les espèces d'insectes considérée comme nuisible pour les cultures agricoles et les jardins est une stratégie efficace dans la vie quotidienne, cependant, l'utilisation généralisée des insecticides chimiques de synthèse a entraîné de nombreuses conséquences négatives pour l'homme et son environnement (**Pavela., 2008**).

Ces produits chimiques peuvent entraîner des résidus toxiques dans les plantes. De même, ils peuvent provoquer la pollution de l'environnement à cause de leur lente dégradation et avoir des effets néfastes sur la santé humaine (**Kordali et al., 2008**).

Ceci a conduit à des réglementations de plus en plus sévères visant la restriction de leur utilisation ou leur interdiction totale en se basant sur des produits naturels (**Pirali-Kheirabadi., 2010**). Parmi les bio insecticides, les végétaux qui connaissent actuellement un regain d'intérêt en raison de leurs propriétés éco-toxicologiques (**Cosimi et al., 2009**) en effet, les vertus thérapeutiques des plantes médicinales et aromatiques ont été expérimentées depuis des siècles et la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant que insecticides et insectifuges, a été rapportée (**Haddouchi., 2008 ; El Ouali Lalami et al., 2013**)

Le marché des biopesticides est en croissance à l'échelle de la planète pour pallier aux inconvénients issus de l'utilisation des produits synthétiques. Plus d'une centaine d'espèces végétales dotées de propriétés insecticides sont répertoriées. La recherche s'est alors orientée vers les composés naturels issus des plantes comme produits alternatifs (**Nerio et al., 2010**). Les propriétés phytosanitaires des diverses huiles essentielles et extraits des plantes sont rapportées. Parmi les différents axes étudiés, la famille des Lamiacées s'est montrée avoir des HEs ayant des effets répulsifs sur les diptères et les coléoptères. À titre d'exemple, l'HE de la menthe est efficace sur une large gamme d'insectes (*Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Acanthoscelides obtectus*, etc.) (**Kumar et al., 2011**).

L'HE du basilic et d'orange (Rutacées) sont toxiques sur les deux coléoptères fréquemment trouvés dans les graines stockées, le *Sitophilus zeamais* et le *Tribolium castaneum* (**Kim et al., 2014**)

L'HE de l'origan a causé la mortalité de 68,3 et 36,7% des adultes des coléoptères *Sitophilus granarius* et *Tribolium confusum* respectivement (**Kordali et al., 2008**). L'HE de la sauge sauvage s'est montrée efficace contre le coléoptère *Tribolium castaneum* (**El Abdouni et al., 2014**). D'autres travaux publiés montrent que l'HE de l'anise (Apiacées) et son composé majeur trans-Anéthole, a accéléré la mortalité des larves et des adultes de *Culex quinquefasciatus* (diptères) (**Pavela., 2014**). L'application de l'HE de l'ail (Alliacées) est toxique sur les coléoptères *Sitophilus oryzae* et *Tribolium castaneum* (**Yang et al., 2010**). L'HE d'eucalyptus (Myrtacées) exerce une activité toxique sur les larves et les nymphes du diptère *Musca domestica* (**Kumar et al., 2012**).

Les activités répulsives des HEs sont liées généralement à la présence des monoterpènes et sesquiterpènes. Dans certains cas, les composés peuvent agir en synergie améliorant leur efficacité. Par exemple, les fortes activités des HEs du basilic et de l'eucalyptus sont dues aux composants présents dans leurs fractions montrant de forte activité répulsive tels que l' α -pinène, le limonène, le citronellol, le citronellal, camphor et le thymol (**Nerio et al., 2010**). Le mode d'action des HEs peut être par contact, inhalation (**Kim et Lee., 2014**), ingestion ou par combinaison de ces modes (**Werdin et al., 2014**).

Les techniques de détermination de l'activité insecticide d'une huile essentielle ont une grande influence sur les résultats. Elles se répartissent en deux catégories principales, la méthode de micro- atmosphère et de contact direct. Quel que soit la technique utilisée, la lecture porte sur le nombre d'insectes morts après un temps bien déterminé d'exposition à l'HE (**Prates et al., 1998**).

I.10. Toxicité des huiles essentielles

Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". A cet égard s'installe les huiles essentielles qui se présentent en tant que produits naturels qui ne peuvent pas être utilisés sans danger, en effet, bien que naturelle, il est capital d'intégrer la notion de la dualité «efficacité-toxicité» car toute substance thérapeutiquement active est potentiellement toxique (**Bruneton., 2009**).

Ainsi que nous l'avons vu ci-avant, les HEs sont des concentrés des molécules actives issues des plantes dont elles sont extraites. Leurs précautions d'emploi doivent être donc en adéquation avec leur puissance. De trop nombreux accidents surviennent à cause du phénomène de mode qui les entoure, et du manque de conseils et d'encadrement qui accompagne leur vente. En outre, la toxicité des HEs est directement liée à leur composition chimique, les composés poly-insaturés étant plus toxiques que les autres (cétones, lactones, phénols..).

Les huiles essentielles qui contiennent des phénols, aldéhydes, phénols méthyl tel que les huiles issues de Citron, Clou de Girofle, Cyprès de Provence, Encens, Estragon, Galbanum, Genévrier, Gingembre éthers doivent être absolument diluées. Si non elles vont causer des dermocausticités. Des Hépatotoxicités sont causées par des huiles essentielles de Lavandula Stoechas, Muscade, Origan Compact, Origan d'Espagne, Origan Vert, Romarin si elles sont administrées par voie orale pour les personnes ayant une sensibilité hépatique ainsi que chez les enfants en dessous de 10 ans.

Les cétones et les lactones contenues dans ces huiles peuvent franchir les enveloppes de protection autour du cerveau, causant une neurotoxicité surtout si elles sont appliquées autour de la tête. (Miles., 2013 ; De bonneval et Dubus., 2014 ; Maillard., 2017).

Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la dangerosité d'une huile essentielle comme la teneur en molécules toxiques, la manière d'appliquer l'huile essentielle, le dosage ou encore la durée de l'application. Il convient donc de tester une huile essentielle avant toute utilisation. De plus, il convient de ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez, yeux...etc), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle. Elle est déconseillée aux femmes enceintes et aux femmes qui allaitent (Chavanne., 2011; Muther., 2015).

Au titre d'exemple, chaque année le centre de contrôle des poisons de l'Association américaine (AAPCC) publie un rapport sur toutes les intoxications ayant été reportées aux USA. Dans ces données figurent celles concernant les huiles essentielles.

En analysant ces données, il s'est démontré que le nombre d'expositions est chaque année en constante augmentation, passant de 3990 cas recensés en 1997 à 12392 cas en 2014, soit plus du triple. Une autre donnée qui ressort de cette étude est celle de l'âge des victimes. Si l'on en croit les valeurs ci-dessus, la proportion moyenne des victimes de moins de 6 ans aux

USA sur la période étudiée approche les 75 %. Généralement à cause de la curiosité naturelle des jeunes enfants les amène à examiner ce qui se trouve à leur portée, souvent en portant à la bouche l'objet de leur curiosité ; leur sensibilité aux substances toxiques et majoritairement, le métabolisme des jeunes enfants est immature.

Un autre exemple, 10ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale chez l'enfant,. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine **(Eisenhut., 2007 in Elkolli., 2008)**.

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL50) comprise entre 2 et 5g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL50 comprise entre 1 et 2g /kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07g/kg), de Chénopode (0,25g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34g/kg) **(Bruneton., 1999)**.

Chapitre II :

*Procédés d'extraction et d'analyse
des huiles essentielles.*

II .1. Procédés d'extraction des huiles essentielles et des molécules aromatiques

Il est important d'éliminer les composés aromatiques de leur matrice avant de pouvoir les utiliser. Plusieurs méthodes d'extraction sont en cours de développement. La plus ancienne méthode utilisée pour extraire les huiles essentielles est la distillation (**Wilson., 2010 ; Başer et Buchbauer., 2010**).

Malgré la mise au point de plusieurs méthodes d'extraction innovantes, seules trois méthodes d'obtention d'HE à usage thérapeutique sont autorisées par la pharmacopée européenne : l'entraînement à la vapeur d'eau, la distillation sèche et l'expression à froid pour les HE des péricarpes des plantes du genre *Citrus* (**Afssaps., 2008**).

Ils peuvent être appliqués à la pression ambiante, en surpression ou en dépression sur des structures discontinues ou continues (**Romdhane et Tizaoui., 2005 ; McDonald et al., 2016**). En fonction des paramètres impliqués dans le processus, la période de distillation peut être réduite de quelques minutes à 30 heures. Ainsi les principes des techniques traditionnelles et des procédés innovants d'extraction sont décrits ci-dessous.

II .2. Choix de la méthode d'extraction

Selon **Fernandez et Cabrol-Bass., 2010**, la complexité et la diversité des huiles essentielles rendent délicat le choix des procédés d'obtention. La méthode choisie ne doit pas entraîner de discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradation thermique, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de modification du pH ou de perte de composés volatils. À cette fin, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte tels que: la volatilité, la solubilité, la taille et la forme des molécules constitutives et la nature de la matière première. Les principales opérations industrielles ont été résumées dans la **figure II.1 (Peyron., 2002)**.

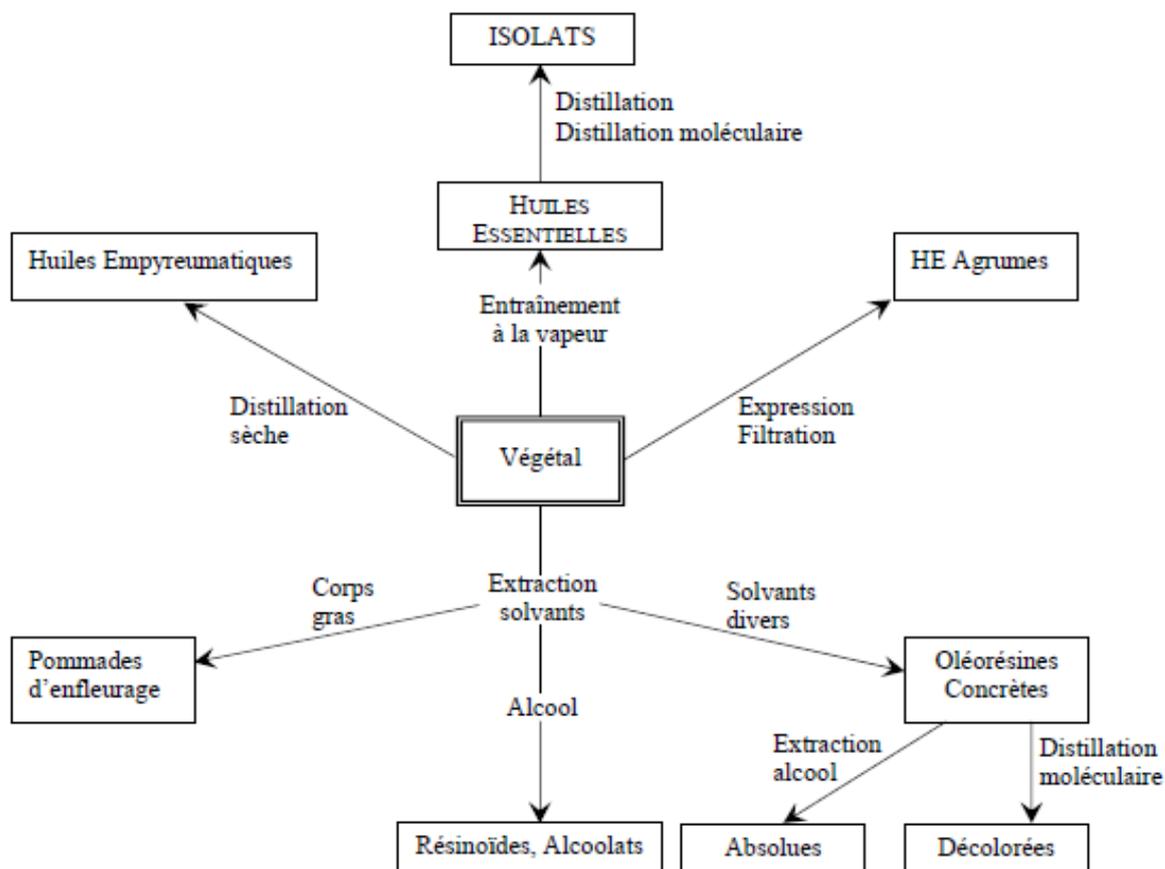


Figure II.1: Principales opérations industrielles d'extraction (Peyron., 2002)

Les techniques les plus couramment utilisées et quelques types de produits fabriqués sont résumés dans le **tableau.II.1 (Peyron., 2002)**. Ces techniques d'extraction mettent en œuvre la plupart du temps, plusieurs types d'opérations fondamentales. Les principales opérations industrielles ont été résumées dans le même tableau.

Tableau II.1: Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction. (Source: Peyron., 1992).

Techniques	Propriétés	Produits fabriqués
Evaporation Déshydratation – Séchage Concentration de miscella (S/pres. atm. ou réduite) Concentration de jus de fruits	Volatilité	Résinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (S/pres. atm. ou réduite) Distillation sèche		Isolats, déterpénés Huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (S/pres. atm. ou en surpression) Hydrodistillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (S/pres. atm. ou réduite) Alcool Polyols		Huiles essentielles Eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaires
Extraction liquide / solide Solvant conservé : Corps gras Alcool Solvant éliminé: Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique)	Solubilité	Pommade Infusion – Teinture } Concrète, résinoïde
Extraction liquide / liquide Discontinue Continue		Essences déterpénées
Cristallisation après concentration partielle et refroidissement		Menthol – Anéthol
Broyage – tamisage Expression – Filtration Glaçage – Filtration Séparation au moyen de membranes	Formes et taille des particules	Huiles essentielles d'agrumes
Séparation chromatographique Décoloration		Huiles essentielles Absolues

II.3. Mode d'extraction

Les composés aromatiques doivent être extraits de leur matrice avant de pouvoir les utiliser. Plusieurs méthodes d'extraction sont mises au point. La distillation est le procédé le plus anciennement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (**Başer et Buchbauer., 2010; Wilson., 2010**). Bien que plusieurs méthodes d'extraction innovantes aient été mises au point, seules la distillation et l'expression à froid permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes à la pharmacopée européenne. Même si les procédés innovants n'aboutissent pas à des huiles essentielles au sens réglementaire, ils permettent l'obtention de plusieurs constituants des HEs et des principes aromatiques intéressants. Ainsi les principes des techniques traditionnelles et des procédés innovants d'extraction sont décrits ci-dessous.

II.3.1. Distillation

La distillation peut être caractérisée comme la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage gazeux (ébullition ou sublimation) selon l'application de la loi de Dalton (**Bocchio., 1985**) (**Annexe 1**). C'est la procédure d'extraction la plus ancienne, et toujours la plus utilisée. (**Franchomme et Penoel., 1990 ; Bruneton., 1999**).

Selon **Piochon., 2008** trois différents procédés utilisant ce principe, présentés par: l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion.

II.3.1.1. Distillation par entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des moyens officiels d'obtenir des huiles essentielles (**Fig. II.2**).

La plupart des composés volatils contenus dans les plantes peuvent être entraînés par la vapeur d'eau; en raison de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe, nous pouvons utiliser des méthodes d'extraction par entraînement de la vapeur d'eau. (**Bruneton., 1993**)

Dans cette méthode d'extraction, la matière végétale est placée dans l'alambic sur une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau à un certain endroit.

La plante est en contact avec de la vapeur d'eau saturée mais n'est pas en contact avec de l'eau bouillante.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Neffati., 2010).

La vapeur provoque la rupture d'un grand nombre de glandes qui libèrent leurs composés aromatiques. Ensuite, les huiles essentielles migrent à travers la plante pour entrer en contact avec la vapeur d'eau qui s'écoule à l'extérieur. Jusqu'à la décantation, les vapeurs remplies de composés volatils sont alors condensées. Du fait de leur différence de densité, les HE et l'eau sont séparées en deux phases et les HEs sont ensuite récupérées (Nixon et McCaw., 2001).

Cette technique permet d'éviter les réactions lorsque les constituants des huiles essentielles entrent en contact avec l'eau, ce qui entraîne des modifications de la composition finale de l'extrait.

Elle fonctionne également mieux avec les huiles essentielles qui se trouvent dans les glandes à la surface de la plante.

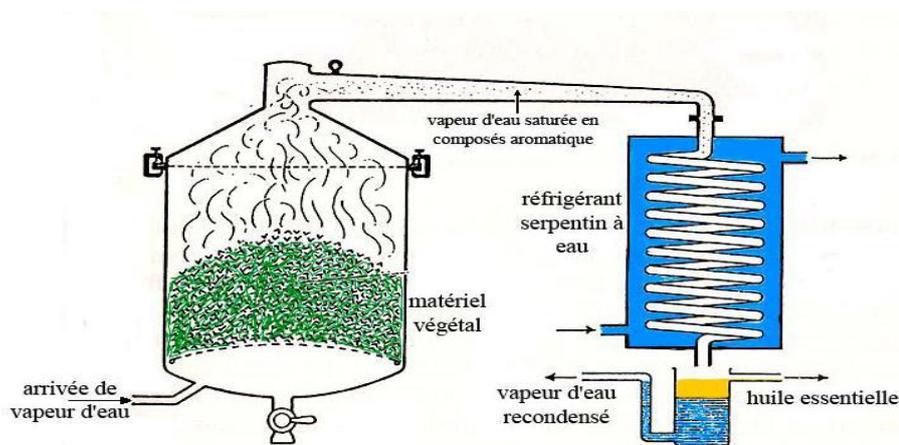


Figure II.2: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau (Lucchesi., 2005)

II.3.1.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode normée par la Pharmacopée Européenne. C'est de loin la procédure la plus appropriée, car elle convient à la plupart des plantes.

À la différence de l'entraînement à la vapeur, la matière végétale à distiller se trouve en contact direct avec l'eau car le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau (**Fig.II.3**). L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme les HEs sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles (**Fasty., 2007**).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Durant l'hydrodistillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'huile essentielle contenue dans les cellules de la plante. La solution aqueuse chargée de composés volatils, diffuse ensuite à travers le tissu de l'organe végétale vers la surface extérieure où l'huile essentielle sera vaporisée. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotrope. À la température d'ébullition, les pressions de vapeurs combinées sont égales à la pression d'évaporation. Ainsi, les huiles essentielles, dont les points d'ébullition varient normalement de 200 à 300°C, s'évaporent à une température proche de celle de l'eau. Le mélange est ensuite refroidi. L'eau et les HEs, une fois condensées, se séparent en deux phases (**Bruneton., 1999 ; Başer et Buchbauer., 2010**). Le contact du matériel végétal avec l'eau dans cette technique engendre notamment des phénomènes d'hydrolyse. Même si la distillation (hydrodistillation ou distillation à la vapeur) est la méthode de choix pour standardiser l'extraction des huiles essentielles, Le chauffage, prolongé et trop puissant, engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi., 2005**).

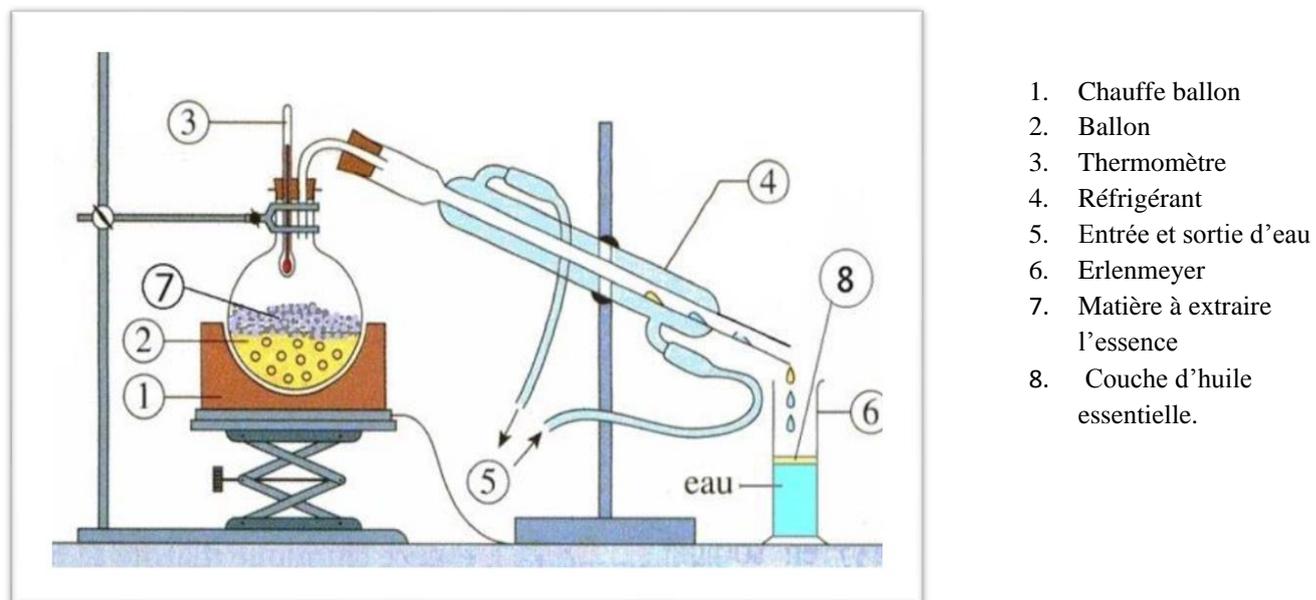


Figure II.3: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi., 2005)

II.3.1.3. Méthode d'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé (**Fig.II.4**). Sa réalisation consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite (0.02-0.15 bar) la vapeur d'eau à travers une matrice végétale.

L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut également affirmer qu'il existe un cycle de cohobation, qui renvoie dans la chaudière toute l'eau extraite des huiles (**Wijesekara et al., 1997**).

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration quantitative et qualitative de l'huile essentielle (**Bassereau et al., 2007**).

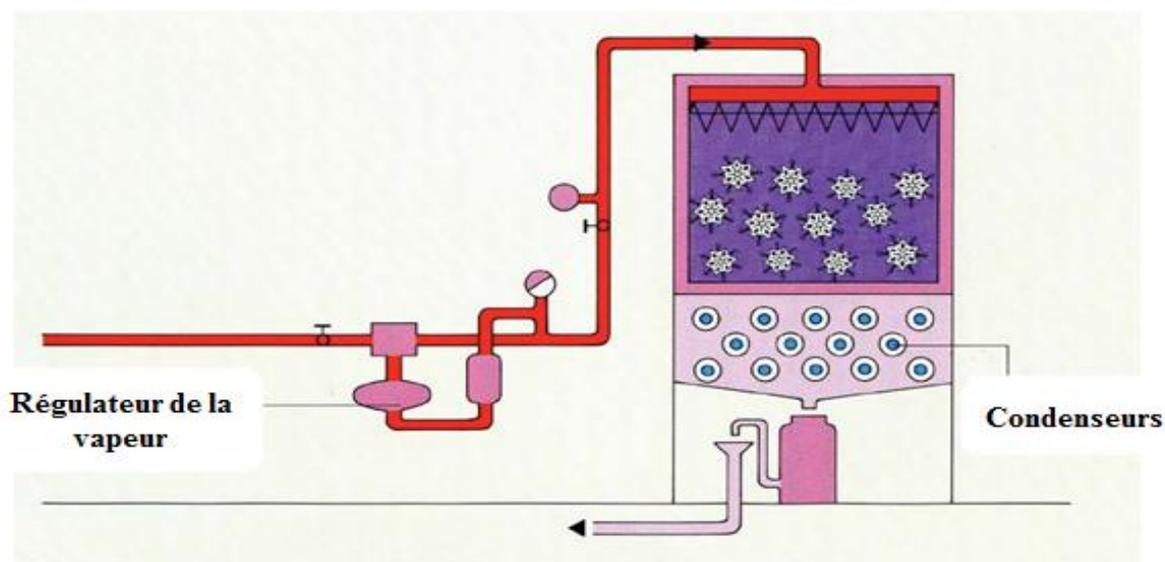


Figure II.4: Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia., 2011).

II.3.2. Turbo hydrodistillation

Le processus d'hydrodistillation peut être amélioré par l'installation d'un agitateur électrique dans le mélange d'eau et de plantes pendant toute l'opération d'extraction.

Il est équipé de lames pour cisailer et déstructurer la matrice végétale (Fig. II.5).

Il est donc préférable d'utiliser l'agitation, ce qui permet de réduire le temps de distillation d'un facteur 2 ou 3, ce qui entraîne une réduction de la consommation de vapeur de chauffage et donc une réduction de la consommation d'énergie.

Cette technique offre en outre l'avantage d'extraire les huiles essentielles des plantes distillable (racines, bois, ail et bulbes d'oignons) (Chemat *et al.*, 2012).

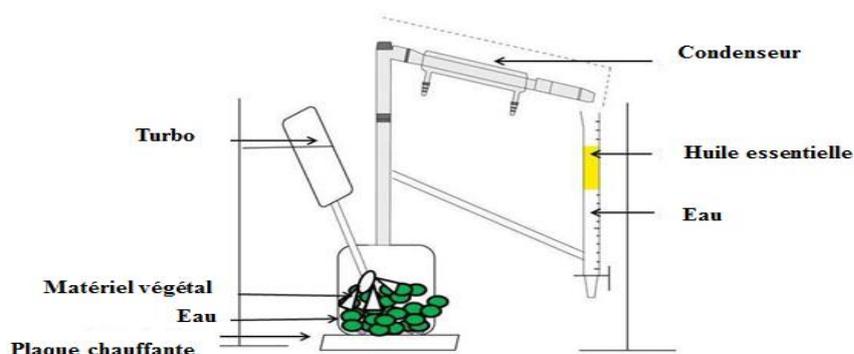


Figure II.5: Extraction par turbo hydrodistillation (Mnayer., 2014)

II.3.3. L'expression à froid

Cette méthode est également utilisée pour l'extraction des huiles naturelles des agrumes. Il s'agit d'une extraction sans chauffage, le concept étant la séparation mécanique des poches de substance.

L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Chaintreau *et al.*, 2003).

Le but de cette technique est d'obtenir une essence qui n'a subi aucune modification chimique liée à la chaleur. De même, elle est combinée à la production de jus de fruits. (Wilson., 2010 ; Başer et Buchbauer., 2010).

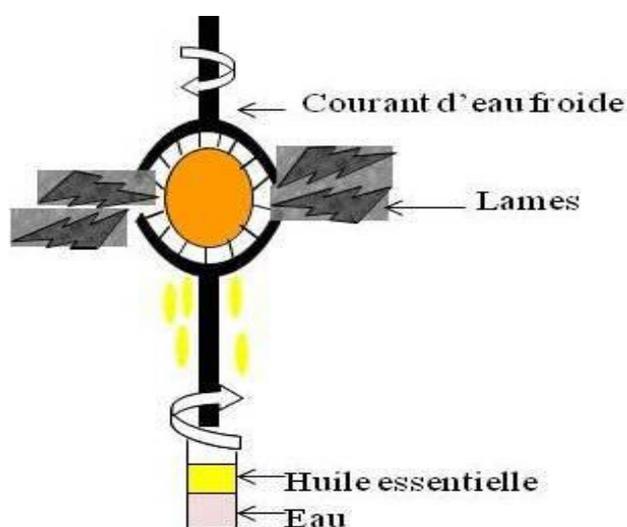


Figure II.6: Extraction par expression à froid. (Mnayer., 2014)

II.3.4. Extraction des molécules aromatiques (concrètes et absolues)

Certaines plantes contiennent peu de molécules aromatiques qui rendent difficile l'obtention d'une huile essentielle. De plus, les composés odorants au cours de la distillation peuvent être sensibles et s'ajuster sous l'action de la chaleur.

C'est également le cas des fleurs (jasmin, rose, fleur d'oranger) dont le rendement en HEs est très faible, ou de nature odorante trompeuse par rapport au parfum de la fleur.

Par exemple, l'extraction sous forme d'absolue permet à ces fleurs de trouver leur parfum plus fidèlement et plus efficacement. Deux procédés, l'enfleurage et l'extraction par solvant, sont utilisés à cet effet.

II.3.4.1. Enfleurage

L'enfleurage est une technique ancienne utilisée principalement en parfumerie pour l'extraction des plantes aromatiques destinées surtout à la parfumerie. Le principe consiste à placer les fleurs odorantes dans la graisse, afin que les arômes puissent y pénétrer. Une fois saturée, celle-ci est ensuite lavée à l'alcool pour extraire les composés odorants. L'alcool obtenu est ensuite évaporé pour donner l'absolue.

Cette méthode est peu utilisée de nos jours à cause de l'utilisation de la graisse animale et du coût de production élevé. Elle a été remplacée par l'extraction aux solvants (**De Silva., 1995; Wilson., 2010**).

II.3.4.1.1. L'enfleurage à froid

Ce procédé d'extraction est réservé aux produits de très haute qualité et n'est plus utilisé très fréquemment. Les parfums particulièrement délicats peuvent également être captés dans la graisse froide par enfleurage.

Le meilleur moyen d'y parvenir est de suspendre les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures.

Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins pour intensifier encore plus la senteur.

L'enfleurage est l'aspect royal de la production de parfums, car il permet également de préserver des fragrances particulièrement délicates dans leur grande qualité et leur pureté.. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (**Möller., 2008**).

II.3.4.1. 2. L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés.

Les plantes y sont incorporées et détrempées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Après une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (Möller., 2008).

II.3.4.2. Extraction aux solvants

Le processus est utilisé pour les organes végétaux présentant une faible concentration en essence ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation.

Cette méthode consiste à faire macérer les fleurs dans un solvant hydrocarboné apolaire. On utilise comme solvant organique volatil l'hexane, qui est le plus utilisé actuellement; le benzène très utilisé dans le passé mais interdit pour des raisons de toxicité; le propane; le toluène, etc (Stagliano., 1992 ; Peron et Richard., 1992).

Les essences étant de nature huileuse, ils sont solubles dans les solvants organiques. Un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète» (Belaiche., 1979 ; Duraffourd *et al.*, 1990)

Cette dernière comprend des composés aromatiques, des cires et des composés huileux de la plante. À ce niveau, la concrète ne peut pas être utilisée dans la parfumerie.

Les cires présentées dans leur composition rendent la solution trouble et donc peu soluble dans la base de parfum. La macération de la concrète dans l'alcool permet de réduire la cire et de recueillir l'absolue.

La solution alcoolique est ainsi homogénéisée par une forte agitation entre 30-60°C puis réfrigérée entre -5 et -10°C de sorte que les cires peuvent être éliminées par précipitation.

Les cires ne sont pas solubles dans l'alcool à des températures inférieures à -1 °C. L'alcool est ensuite évaporé pour donner l'absolue très prisée des parfumeurs (De Silva., 1995; Nixon et McCaw., 2001; Wilson., 2010).

II.3.5. Extraction aux ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui peuvent se déplacer dans un milieu élastique à des fréquences supérieures au niveau d'audibilité moyen de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons de puissance qui fonctionnent à une intensité comprise entre 20 et 100 kHz sont utilisés pour éliminer les arômes des plantes et de nombreuses autres molécules. La cuve ou la sonde ultrasonore sont les deux types d'équipement largement utilisés dans les laboratoires (**Fig.II.6**).

Au fur et à mesure que les ultrasons se propagent dans un liquide, les oscillations moléculaires provoquent la formation de zones de compression et de dépression (raréfaction). Lorsque les cycles de raréfaction augmentent, les forces qui maintiennent le liquide ensemble sont surmontées et des bulles de cavitation émergent.

Cette condition est connue sous le nom de cavitation. À proximité de la surface solide (matière végétale), les bulles peuvent imploser et provoquer l'éclatement des membranes cellulaires, envoyant leur contenu vers l'extérieur (**Dolatowski et al., 2007**).

Étant donné que les glandes d'huiles essentielles sont généralement situées à la surface des plantes aromatiques, l'implosion des bulles de cavitation tue les glandes qui libèrent l'HE dans le milieu environnant. (**Veillet et al., 2010**).

La technologie des ultrasons connaît un essor important l'industrie alimentaire. (**Chemat et al., 2011; Pingret et al., 2013**). Elle contribue à résoudre certains problèmes rencontrés par la distillation traditionnelle, notamment la grande consommation d'eau, les longues durées d'extraction, la difficulté d'extraction de molécules thermosensibles et les rendements faibles (**Lagunez-Rivera., 2006 ; Da Porto et al., 2009**).

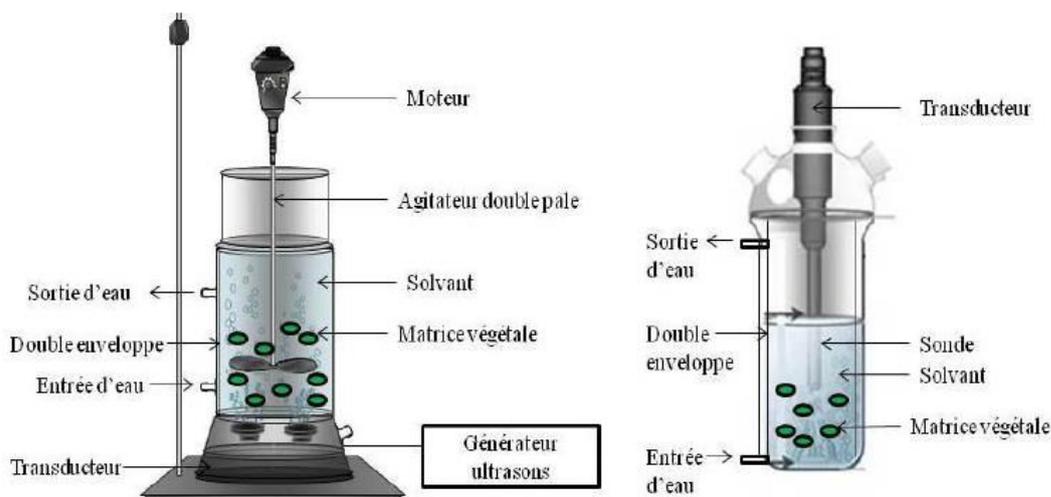


Figure II.7: Extraction aux ultrasons: bac et sonde.

II.3.6. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

L'extraction par micro-ondes sans solvant a été développée pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques pour une utilisation en laboratoire.

Les micro-ondes constituent, par ailleurs, une méthode d'extraction en plein développement (**Fig.II.7**). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dont les micro-ondes sont combinées aux autres méthodes traditionnelles d'extraction.

Cette méthode permet de réaliser des extractions du matériel végétal frais à pression atmosphérique, sans ajout d'eau ou de solvant. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition (**Brian., 1995**).

Un système de refroidissement situé à l'extérieur du four à micro-ondes provoque la condensation continue du distillat, puis le mélange est dirigé vers l'appareil Clevenger où les composés aromatiques sont recueillis par simple séparation des phases.

L'excès d'eau est réintroduit dans le réacteur de manière à restaurer la quantité d'eau initialement présente dans la plante.

A la différence de la distillation classique, l'extraction assistée par micro-ondes sans solvant permet l'obtention d'une huile essentielle quantitativement et qualitativement similaire aux autres méthodes en une durée d'extraction plus courte toutefois, l'extraction des composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives que les monoterpènes est favorisée (Lucchesi *et al.*, 2004).

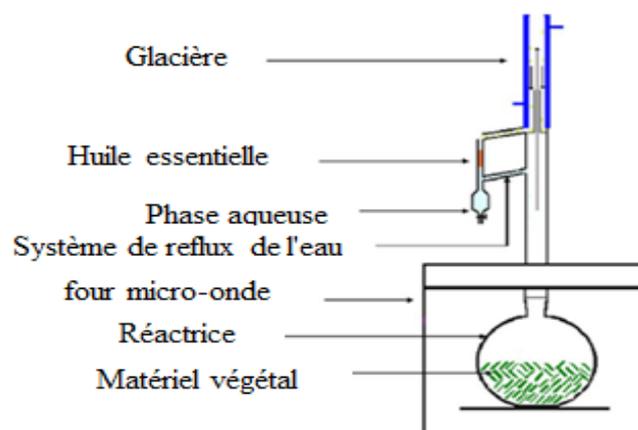


Figure II.8: Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes (Lucchesi *et al.*, 2004)

II.3.7. Extraction par le CO₂

Cette technique trouve son originalité dans le solvant utilisé: il s'agit du CO₂ en phase supercritique. En tenant compte qu'au-delà du point critique, un fluide peut avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz, d'où une bonne diffusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvant.

Le CO₂ à l'état supercritique, ne se présente ni sous forme liquide ni sous forme gazeuse, ce qui lui confère une excellente puissance d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre.

L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T=31.1°C) (Lorrain., 2013) (Fig.II.8).

La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique (sous pression et réfrigéré). Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite.

Le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle (**Grosso et al., 2008 ; Safaralie et al., 2008**). Sachant que la température et la pression à ne pas dépasser 60°C et 60 bars. (**Richard., 1992**).

Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux (**Peron., 1992**). Les avantages de ce procédé sont les suivants:

- Le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux (**Bruneton., 1999 ; Wichtel et Anton., 1999**).
- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO₂ à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse (**Bruneton., 1999**).

Comparativement aux méthodes classiques d'extraction, l'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court (**Scheffer., 1996**).

Cependant l'installation industrielle de ce procédé reste onéreuse, et l'appareillage est encore envahissant.

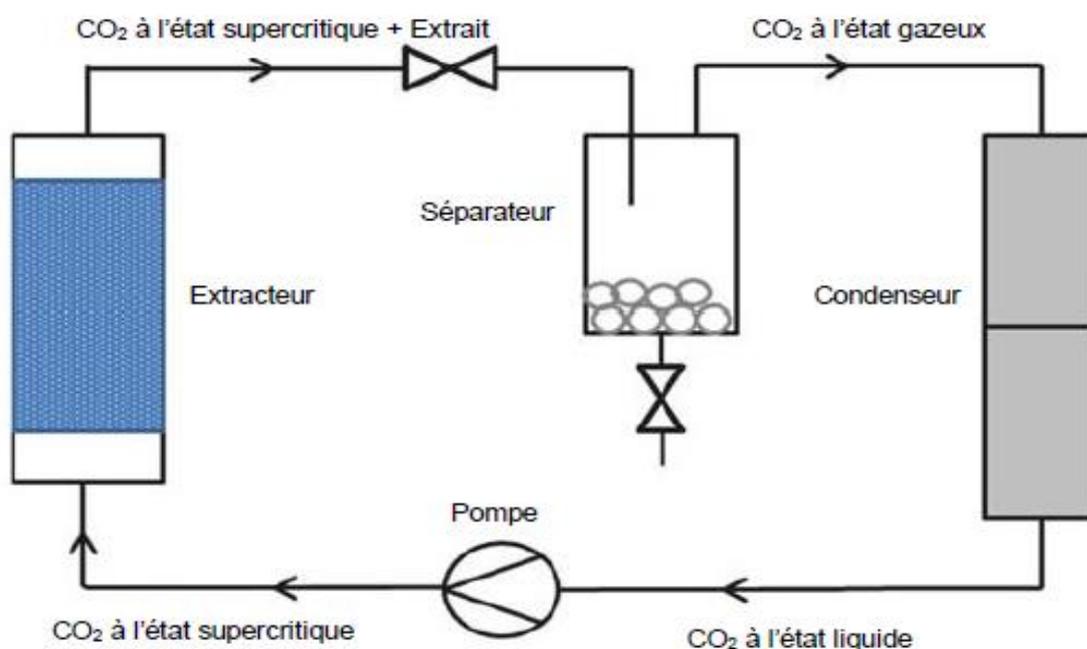


Figure II.9: Schéma du procédé de l'extraction par CO₂ supercritique (**Meullemiestre et al., 2015**).

II.3.8. Détente instantanée contrôlée

Une autre méthode d'extraction visant aussi l'avantage de réduction du temps, une moindre consommation d'eau et d'énergie et une augmentation de rendement est représenté par le procédé de la détente instantanée contrôlée (**Fig.II.9**), qui consiste en un traitement du matériel végétal frais pendant une courte durée à haute température (180°C) et à haute pression (10 bars) suivie d'une détente abrupte vers le vide qui provoque l'auto-vaporisation instantanée d'une partie de l'eau et des composants volatils (**Besombes et al ., 2010**).

En conclusion, il n'existe pas de méthode meilleur que d'autres. Chaque processus possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commande ainsi que l'aspect économique qui est tout aussi important (**Collin., 2000**).

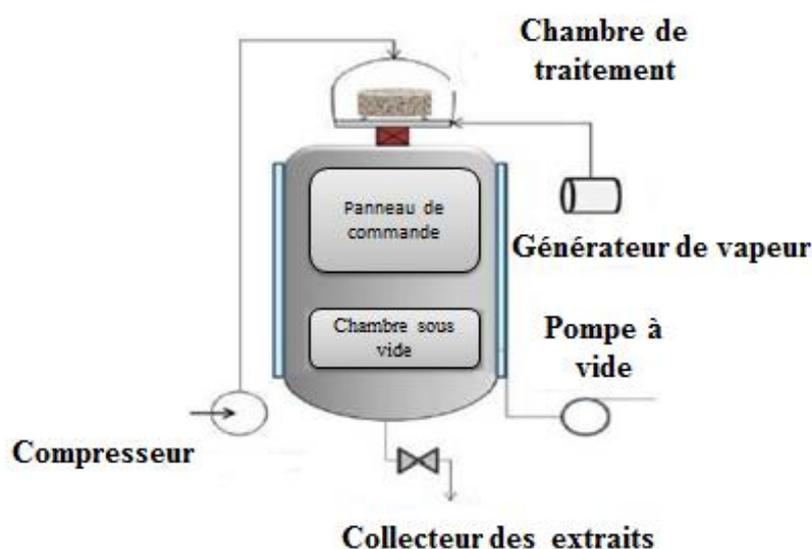


Figure II.10: Extraction par détente instantanée contrôlée. (**Mnayer., 2014**)

II.4. Identification de la composition des huiles essentielles

En matière d'utilisation des huiles essentielles (industries pharmaceutique et alimentaire, parfumerie, cosmétiques), une parfaite connaissance de leur composition chimique est prépondérante pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Une phase importante reste donc l'analyse des huiles essentielles qui consiste en des méthodes de séparation et des méthodes d'identification des composants.

Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (**Joulain., 1994**).

Diverses techniques et méthodes permettent d'évaluer quantitativement et qualitativement les huiles essentielles.

Parmi ces méthodes, on peut citer les méthodes micro-analytiques qui permettent d'identifier et le dosage des produits même à l'état de traces.

On peut utiliser les méthodes suivantes: CG, GC/MS, HPLC, RMN, IR, etc. ces dernières concernent l'identification quantitative et qualitative des différents constituants d'une huile essentielle cependant la chromatographie représente le procédé fréquemment utilisé afin de séparer les constituants des huiles essentielles (**Schwedt., 1993**)

II.4.1. Principe de fonctionnement de principales méthodes existantes

II.4.1.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse demeure une des techniques clés de l'identification et l'individualisation de nombreux composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Elle permet leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir). Cette technique s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur (**Arpino et al., 1995**).

Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Le chromatographe en phase gazeuse est composé de trois modules: un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur (**Fig.II.10**) (**Bouchonnet et al., 2002**).

La solution est injectée au moyen d'une seringue soit manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité, la température de la chambre d'injection est réglée telle que la vaporisation de l'échantillon se fasse dans un temps le plus court possible. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (hélium, azote, argon ou hydrogène) (**Audigie et al., 1995 ; Skoog et al., 2003**).

Le mélange traverse une colonne ou s'effectue une opération entre les différents constituants, à la sortie de la colonne de chromatographie, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leurs pressions relatives de vapeur et de leurs affinités pour la phase stationnaire. Au moment où les analytes arrivent au niveau de détecteur (le détecteur à ionisation de flamme DIF ou FID est le plus fréquemment utilisé).

Un signal est enregistré engendrant un chromatogramme sous forme de pics qui sont caractérisés par un temps de rétention qui correspond au temps écoulé entre l'injection de l'analyte et l'instant de son arrivée au détecteur en outre une surface le caractérise qui permettent de déterminer l'identité du constituant ainsi que sa proportion dans le mélange (Chenni., 2016).

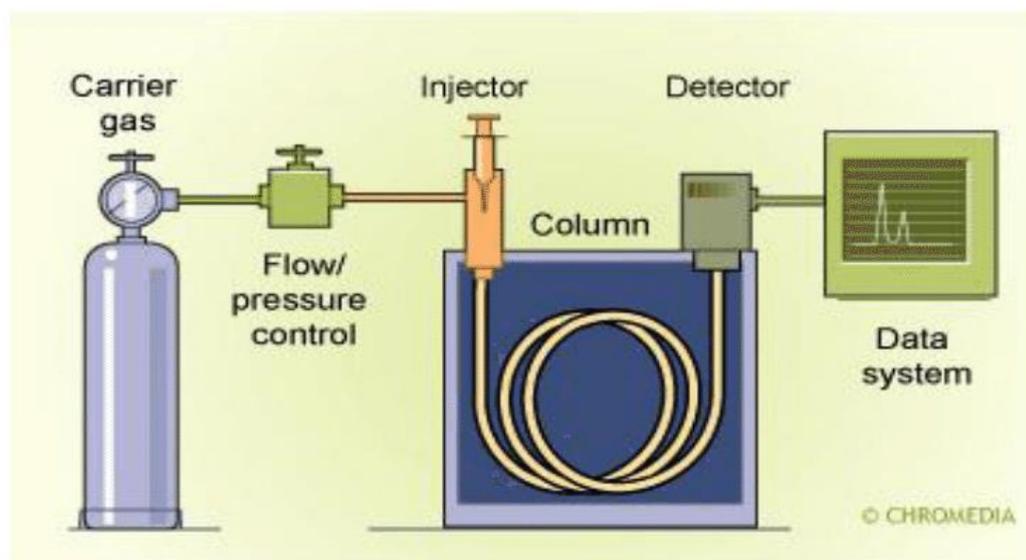


Figure II.11: Schéma descriptif d'une Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
(Tidjani., 2016)

II.4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)

La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles (Fig.II.11). Ce couplage est traité dans de nombreux ouvrages généraux de spectrométrie de masse (Millard., 1978 ; Sparkman., 2000 ; Downard., 2004 ; Traldi *et al.*, 2008).

Le but de cette association après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique (De Maack et Sablier., 1994).

Considérant que la spectrométrie de masse SM peut être déterminée comme l'étude des systèmes par la formation d'ions gazeux, avec ou sans fragmentation qui sont ensuite caractérisés par leur rapport masse sur charge m/z et l'abondance relative, l'analyte peut être ionisé par voie thermique, par un champ électrique ou par impact énergétique d'électrons, des

ions ou des photons la GC-MS est très bien connue pour la détermination des composés volatils contenus dans les échantillons complexes de parfums, d'arômes et d'HEs (Liang *et al.*, 2004 ; Senatore *et al.*, 2004 ; Chenni., 2016).

Le concept consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse via la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse où ils seront décomposés en ions de masse variable dont la séparation dépendra de leur masse. (Desjobert *et al.*, 1997 ; Bruneton., 1999).

L'identification est ensuite effectuée en comparant les indices de rétention (Ir) et les données spectrales (masse spectres) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Paolini *et al.*, 2005). Les indices de rétention demeurent un outil efficace afin d'augmenter la fiabilité des résultats de l'analyse et d'aborder la détermination qualitative des compositions d'échantillons par la GC-MS, leur combinaison avec les informations structurales.

Cependant, Cavalli a affirmé en 2002 que la grande différence de pression reste la principale difficulté rencontrée lors de ce couplage. En effet, la spectrométrie de masse nécessite un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se fait à un niveau de pression plus élevé, ainsi, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles.

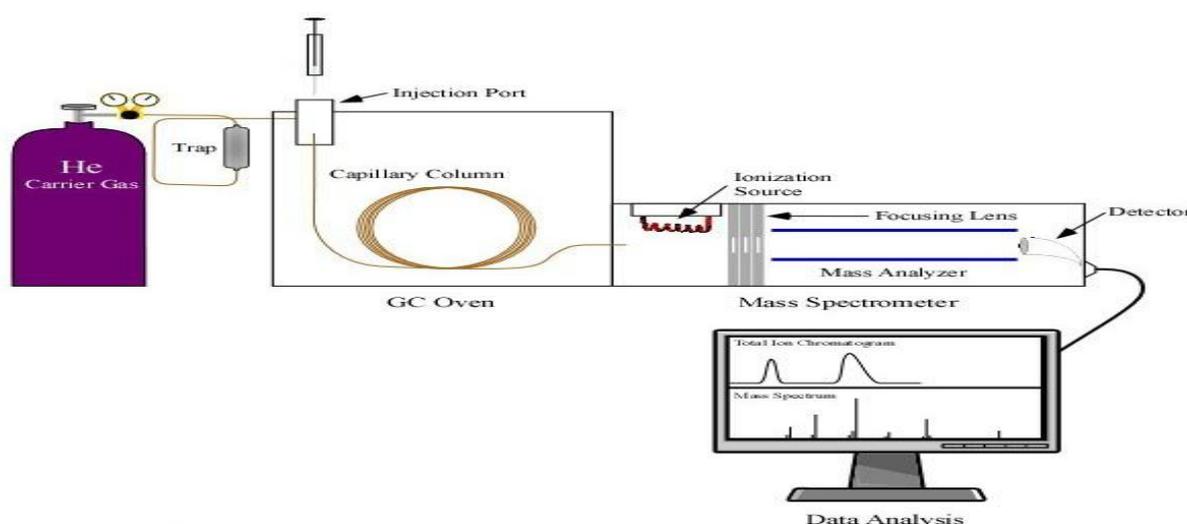


Figure II.12: Schéma d'un système GC-MS (Shubin *et al.*, 2014)

Chapitre III :

Ciste de feuilles de sauge

Cistus salviifolius L.

III.1. *Cistus salviifolius* L.

III.1.1. Synonyme

Cistus salviifolius L. = *Cistus corbariensis* Rchb. (Burnat., 1892).

III.1.2. Noms communs

Du latin *salvia*: sauge; feuilles ressemblant à celles de cette plante (Fig. III.1) (Rameau *et al.*, 2008).

Berberes: agûllîd, tuzzalt, tuzzale (Aït Youssef., 2006) ; **Arabe:** Cfeira, irgel (Quezel et Santa., 1963) ; chtib (Alaoui et Laaribya., 2017), aussi appelée "Melliya" (Rebaya *et al.*, 2016).

Français: Ciste à feuilles de sauge, ciste femelle ; **Anglais:** Sage-Leaved, Rock-rose ; **Espagnole:** Jaguarzo marisco ; **Itali:** cisto femmina ; **Allemand:** salbei blattige cistrose (Rameau *et al.*, 2008).

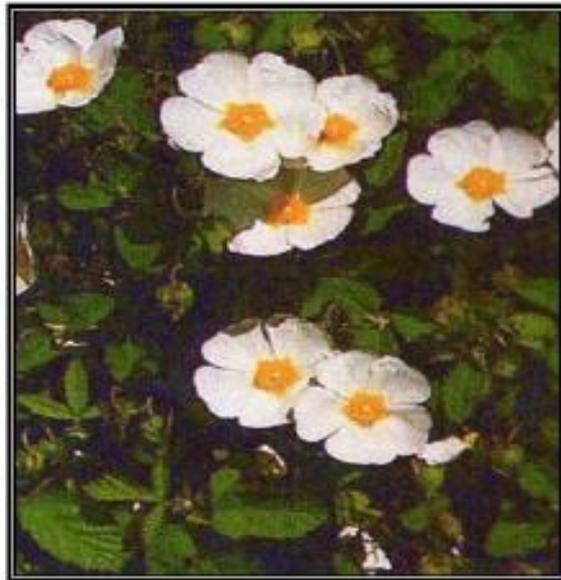


Figure III.1: *Cistus salviifolius* L. (Bayer *et al.*, 1990)

III.1.3. Classification systématique

La classification de *C salviifolius* L. est mentionnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.1: Classification systématique du *C salviifolius* L. (Guignard., 2001)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Super ordre	Eurosidées II
Ordre	Violales
Famille	Cistaceae
Genre	Cistus
Espèce	<i>Cistus salviifolius</i>

III.2. Aperçu de la famille des Cistacées

Les cistacées sont une famille méditerranéenne indigène comprenant environ 200 espèces d'arbustes (Ferrandis *et al.*, 1999), réparties dans les zones tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, spécialement dans les climats méditerranéens (Guzman et Vargas., 2009).

Cette famille se compose de différents genres, dont *Halimium* et *Cistus* (Guzmán et Vargas., 2005), recouverts par un tas de fleurs. (Bedoya *et al.*, 2009).

Les espèces de cette famille sont arbustives ou herbacées, vivaces ou annuelles, velues ou poilues, avec un réceptacle en forme de cône bas, portant de bas en haut le périanthe, l'androceae et le gynécée. Elles portent des fleurs axillaires ou terminales, solitaires, en épi ou disposées en cymes racémiques ou paniculiformes (Baillon., 1872 ; Herrera., 1992).

Elles possèdent un calice qui est à trois ou à cinq divisions très profondes, leur corolle à cinq pétales libres est très feuillus et très délicats, étalés et sessiles, souvent dessinés, mais généralement dans le sens inverse de la fleur (Brizicky., 1964 ; Raynaud., 1987 ;

Güemes., 1999 ; Arrington et Kubitzki., 2003). Les fleurs sont généralement hermaphrodites ou bisexuées (Guzmán et Vargas., 2009).

Pour cette famille, les spécialistes reconnaissent généralement huit genres: *Cistus*, *Fumara*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocantemum*, *Hudsonia* et *Lechea* (Arrington et Kubitzki., 2003 ; Guzman et Vargas., 2009).

III.2.1. Genre *Cistus* L

Les cistes sont de petits arbustes ligneux à la tige droite, dont les branches opposées s'étendent en largeur et peuvent atteindre en moyenne un mètre de hauteur.

Sur les branches poussent des feuilles généralement ondulées, simples et indivisibles, soit pétiolées soit sessiles, poussant en opposition ou en alternance, et portant de simples poils épidermiques (trichomes) soit en astéroïde soit en grappes.

Dans les Cistes, deux types de trichomes apparaissent, le non-glandulaire ou stellaire et le glandulaire, qui sécrètent un exsudat résineux, le ladano, auquel ils doivent leur odeur aromatique caractéristique (Gulz *et al.*, 1996).

Les plantes ont une inflorescence terminale ou axillaire en cymose, chez certaines espèces en ombelle, avec une cyme scorpioïde unilatérale, et par réduction des fleurs solitaires. Les fleurs sont éphémères, stimulées par la lumière du matin, ont des pétales blancs ou rose/violet. Il y a de multiples étamines alors qu'il y en a 5 carpelles dans l'ovaire (cependant il peut en avoir jusqu'à 6-12). Le style est droit, généralement long et discret, et le stigmate est grand, discoïde avec 5-12 lobes (Demoly et Montserrat., 1993).

En Algérie, le genre *Cistus* est présenté principalement par les espèces suivantes : *Cistus ladaniferus*, *C. sericeus*, *C. libanotis*, *C. villosus* L., *C. heterophyllus*, *C. salviifolius*, *C. crispus*, *C. albidus*, *C. varius* Pourret, *C. monspeliensis*, *C. incanus* (Quézel et Santa., 1963 ; Zitouni., 2010).

Concernant la réaction de cette plante vis-à-vis des contraintes environnementales, les espèces de cistes présentent également une série d'adaptations spécifiques aux environnements méditerranéens, telles que la germination des graines dépendante du feu, la pollinisation dépendante des insectes, la reproduction dépendante des fleurs et la phénologie dépendante du printemps (Fernández-Mazuecos et Vargas., 2010).

III.3. Description botanique de *Cistus salviifolius* L.

Cistus salviifolius L. est un sous-arbrisseau bas pouvant atteindre 1m de haut, avec des feuilles ovales à arrondies, opposées et pétiolées (Damerdji, 2012) et des fleurs rassemblées dans des cymes de 1 à 3 fleurs, à l'aisselle des feuilles. Elles possèdent 5 sépales inégaux, les extérieurs ovales en cœur. Les 5 pétales forment une corolle blanche de 4 à 6cm de diamètre avec un style très court dont la floraison s'étale de mars à juin, et la pollinisation se fait par les insectes, en outre le fruit est une capsule pentagone (Beniston et Beniston., 1984), de 5-7 mm de long, incluse dans le calice (Fig.III.2). Les graines sont disséminées par les fourmis, les granivores. C'est l'espèce du genre la plus répandue dans le bassin méditerranéen (Papaefthimiou *et al.*, 2014).

Au moins trois colonisations intercontinentales sont responsables de sa large répartition, ce qui entraîne un faible isolement géographique avec une grande diversité génétique au sein des populations, mais aucune différenciation génétique entre les différentes populations de *C. salviifolius* (Farley et McNeilly., 2000 ; Fernández-Mazuecos et Vargas., 2010).

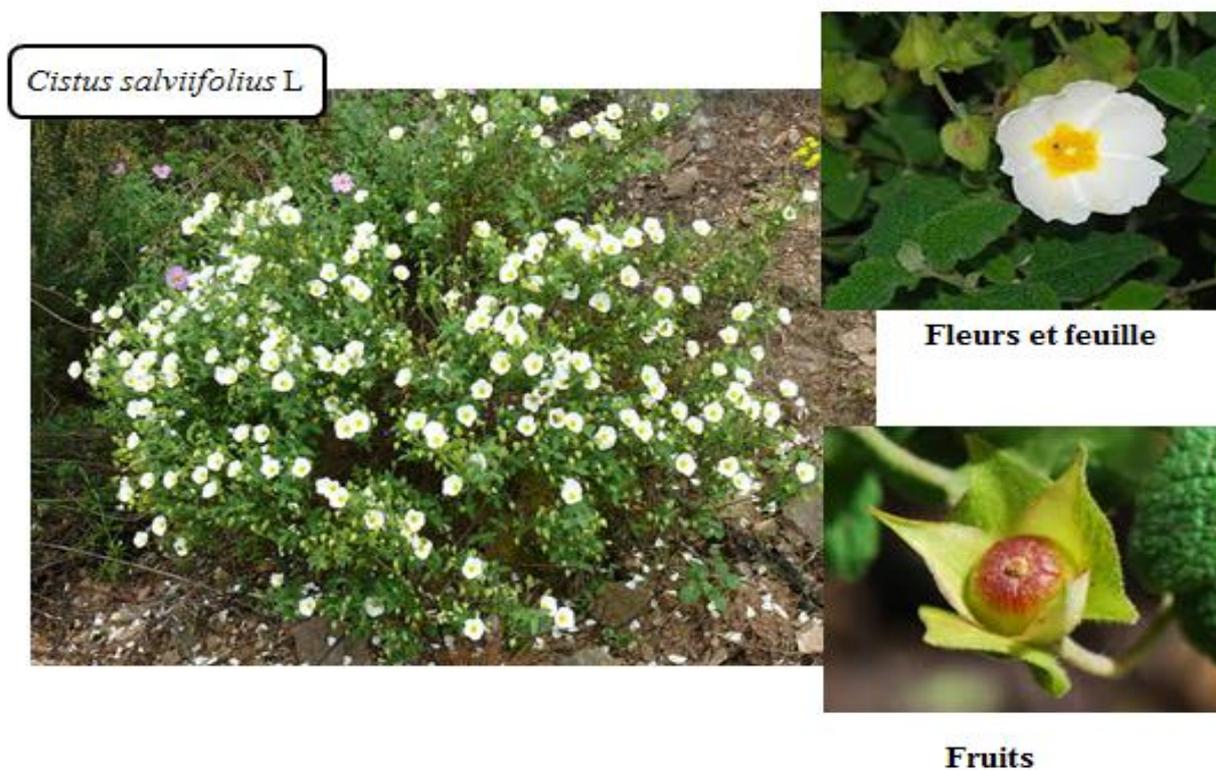


Figure III.2: Description botanique de *Cistus salviifolius* L.

III.4. Répartition géographique

Il s'agit de l'espèce la plus répandue dans le genre (**Rol et Jacamon., 1968**). Elle est présente dans les régions méditerranéennes de l'Europe, de l'Asie et de l'Afrique (**Coste et Flahault., 1937**) (**Fig.III.3**).

En Algérie, elle est très commune dans le tell (**Aït Youssef., 2006**), elle se développe principalement au sein des forêts claires et parmi les broussailles (**Beniston et Beniston., 1984**).

Figure III.3: Carte de distribution du *Cistus salviifolius* L. (**Marco et al., 2006**)



Figure III.3: Carte de distribution du *Cistus salviifolius* L. (**Marco et al., 2006**)

III.5. Caractéristiques autoécologiques, biotope et phytosociologie

C. salviifolius L est à la fois une espèce opportuniste, héliophile et pyrophile (Moretti *et al.*, 2006).

Cet arbuste pionnier qui n'est pas particulièrement tolérant à la concurrence, a la capacité de coloniser rapidement les milieux perturbés et les sites fraîchement brûlée, sur sols pauvres en substances nutritives et acides à humus de type mull acide à morder. Bien que non calcifuge, elle préfère les sols siliceux grossiers (plus ou moins pierreux), issus de schistes, micaschistes, gneiss, altérites de calcaire siliceux ou dolomitiques (Zitouni., 2010).

En Algérie elle pousse surtout dans les forêts claires et parmi les broussailles (Fig.III.4) (Beniston et Beniston., 1984).



Figure III.4: Répartition géographique de *Cistus salviifolius* L. en Algérie et spécialement dans le parc national de Theniet El had (INPV., 2019).

Les facteurs à l'origine de la dispersion de cette espèce autour de la Méditerranée étaient essentiellement écologiques (**Fig.III.5**), comme le climat et le sol. Elle pousse dans des sols siliceux et calcaires et se trouve sur les sols sableux d'un large éventail d'habitats (**Guzmán et al., 2009**), alors qu'elle est souvent située dans le sous-bois dans les zones boisées (**Farley et McNeilly., 2000**).

Elle affectionne les maquis bas, garrigues, versants rocheux, prairies sèches, lisières forestières, bois clairs (**Bayer et al., 1990 ; Rameau et al., 2008**).

Cette plante a été régulièrement signalée comme plante hôte pour diverses espèces de *Terfezia*, rendant cette plante l'un des meilleurs choix pour la culture planifiée de *Terfezia* dans une grande variété d'habitats (**Alsheikh., 1994 ; Farley et McNeilly., 2000 ; Comandini et al., 2006**).

Les caractéristiques climatiques ainsi que les caractéristiques du sol qu'exigent cette espèce sont illustrées dans la **figure III.5**.

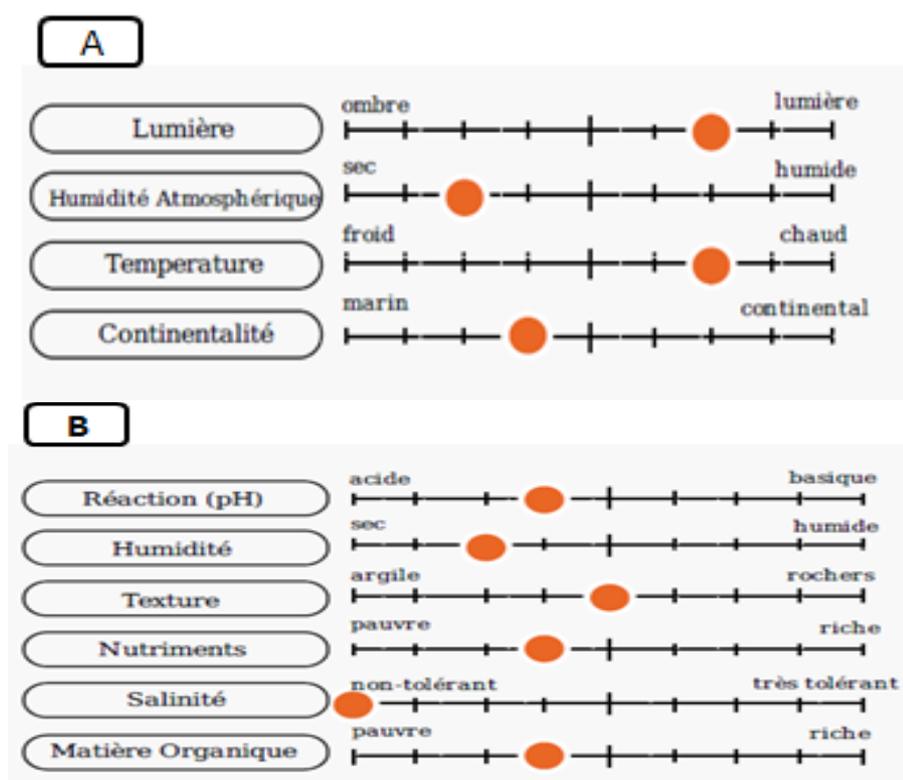


Figure III.5: Conditions écologiques de développement de *Cistus salviifolius* L (Julve., 2020)

A: caractéristiques climatiques **B:** caractéristiques du sol.

III.6. Propriétés, fonctions biologiques et usage

Historiquement, de nombreuses préparations à base de ciste ont été utilisées en médecine traditionnelle dans le bassin méditerranéen, notamment en Italie, en Grèce, en Turquie, et en Espagne.

Parmi les affections et les maladies ciblées, on peut citer: les infections bactériennes et fongiques, les cardiopathies, les catarrhes, la diarrhée, la duodénose, la dysenterie, la dyspnée, fractures, hépatose, hernie, hystérie, infection, inflammation, insomnie, l'anxiété, l'arthrose, l'asthme, la bronchite, divers types de cancer, leucorrhée, myalgie, névralgie, arthrose, polype, proctose, rhinose, utérus, plaie, spasme, splénose, ulcère (**Duke et al., 2008**).

Ainsi, les propriétés pharmacologiques de la résine sécrétée par les feuilles du ciste ont fait l'objet d'un grand nombre d'études (**Papaefthimiou et al., 2014**).

Barrajón-catalán et al (2010), ont démontré que les espèces de *Cistus* ont été utilisées comme recours généraux, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, antiulcérogène, cicatrisation des plaies, anti-microbien (**Demetzos et al., 1999**), antifongique (**Bayoub et al., 2010**), antiviral, anti-tumoral (**Dimas et al., 2000**), cytotoxiques (**Ben jemia et al., 2013**) et antinociceptifs (**Barrajón-Catalán et al., 2010**)

En outre, les composés de ces espèces ont des actions allergisantes, anti-agrégantes, anti-leucémiques, anti-oxydantes, anti-péroxydantes, anti-prolifératives, antiseptiques, astringentes, candidicides, cardio-protectrices, dermo-protectrices, inhibitrice de la dipeptidylpeptidase-IV, inhibitrice de l'alanyl-aminopeptidase, diurétique, gastro-protectrices, myorelaxante (**Duke et al., 2008**).

Les pousses de *C salviifolius* sont consommées et appréciées par le bétail au Maroc. Les feuilles sont utilisées pour le tannage des peaux et la teinture des tissus en Libye, séchées et réduites en poudre, puis imprégnées d'eau (**Aït Youssef., 2006**). Elles sont également utilisées pour préparer un thé et pour le traitement du cancer (**Başlar et al., 2002**).

Les fruits sont utilisés, en usage externe, mélangés avec des fruits de l'espèce *Juniperus phoenica* pour la préparation de la farine à tatouage appelée harkûs, dans le Nord du Maroc.

Les graines sont écrasées et consommées en apéritif par les agriculteurs marocains, ou utilisés comme chapelure sur les gâteaux.

Ils sont consommés en apéritif à Marrakech et préparés avec des épices, et sont également utilisés en tant qu'aphrodisiaque (**Aït Youssef., 2006**).

La résine est très aromatique, cependant ce n'est pas toutes les espèces de cistes qui vont produire systématiquement de la résine et il semble bien qu'au sein d'une même espèce, la production puisse varier en fonction de diverses conditions non clairement identifiées à ce jour. (Nicolas et Elisabeth., 2013)

Cette espèce est utilisée également dans les soins de la bronchite et des hémorragies et (Aït Youssef., 2006).

Selon Hamel *et al.*, (2018), les fleurs de *Cistus salviifolius* L. sont utilisées dans le traitement des douleurs d'estomac.

III.7. Etude chimique de *C salviifolius* L. ainsi que quelques espèces de *Cistaceae*

Les études sur l'effet des espèces de *Cistaceae* contre les agents pathogènes sont limitées.

Une étude réalisée par Rebaya *et al.*, (2016) afin d'évaluer les activités antimicrobiennes et antifongiques des extraits bruts de feuilles et de fleurs de l'*Halimium halimifolium*, et comparées à celles du *C salviifolius* et du *C monspeliensis* contre des bactéries Gram⁺ (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* et *staphylococcus aureus*) et Gram⁻ (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*), ainsi que deux champignons pathogènes (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*), a montré que les feuilles de *C salviifolius* L. avaient la plus puissante action bactéricide. En revanche, *Candida albicans* et *Aspergillus Niger* étaient les micro-organismes les moins sensibles à tous les extraits de *Cistus*.

D'autres travaux ont testé l'efficacité d'un extrait à l'éthanol de *Cistus salviifolius* L. poussant en Espagne et se sont avérés avoir un effet inhibiteur contre *E. coli* et *S. aureus* (Tomás *et al.*, 2013).

En outre, dans le but d'estimer les éventuels effets anti-inflammatoires *in vivo* et les effets analgésiques des extraits aqueux de *C salviifolius* L. et *C monspeliensis* L., une étude a été réalisée par Sayah *et al.*, (2017) au Maroc et dont l'activité anti-inflammatoire a été étudiée à l'aide du test de l'œdème des pattes induit par la carraghénine chez le rat. De même que, l'effet analgésique *in vivo* a été évalué à l'aide des tests de torsion et d'émersion de la queue induits par l'acide acétique.

Les résultats indiquent que les extraits aqueux de *C salviifolius* L. et de *C. Monspeliensis* L. ont des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques centrales et périphériques qui favorisent l'utilisation traditionnelle de ces plantes.

Des études antérieures ont montrés l'existence des composants glycosidiens suivants. Il s'est révélé qu'il s'agit d'un glycoside flavonoïde: quercétine 3-O- α - arabinopyranoside (**Demetzos et al., 1997**).

Deux glycosides de phénylbutanon: 4-(4'-O-[6''-O-galloyl- β -galactopyranosyl]-3'-hydroxyphényl)-butan-2-on (**Bouamama et al., 2006**), 4-(3'-O- β -glucopyranosyl-4'-hydroxyphényl)-butan-2-on (**Guvenc et al., 2005**), un phloroglucinol glycoside: 1-O- β -glucopyranosyl-3,5-diméthoxybenzène (**Hannig et al., 2008**) et un glycoside stéroïde : sitostérol-3-O-(6''-Obutanoyl)- β -galactopyranoside (**Kalus et al., 2009**).

En plus de ces composés, trois flavonol aglycones: quercétine (**Coode., 1988**), myricétine (**Baytop., 1999**) ; trois glycosides flavonoïdes; kaempférol 3-O- β - (6''-O-trans-p-coumaroyl)-glucopyranoside (**Yeşilada et al., 1995**), quercétine 3-O- β -galactopyranoside (**Lendeckel et al., 2002**), myricétine 3-O- β - galactopyranoside (**Barrajon-Catalan et al., 2010**) ; un phloroglucinol glycoside: 1-O- β -glucopyranosyl-3,5-diméthoxybenzène (**Mrabet et al., 1999**) ; un aglycone stéroïde: β -sitostérol (**Droebner et al., 2007**) ; un glycoside stéroïde : Sitostérol-3-O- β -glucopyranoside ont été isolés des parties aériennes du *Cistus salviifolius* L.. Leurs structures ont été identifiées à l'aide de méthodes spectrales (UV,IR, 1D- et 2D-NMR, et ESI-MS) (**Ehrhardt et al., 2007**).

La comparaison des activités anti-inflammatoires (anti-5-lipoxygénase (5-LOX)) et cytotoxiques (OVCAR et MCF-7) entre les feuilles et les bourgeons floraux (FB) de *Cistus salviifolius* extraits séparément avec du méthanol (MeOH) à 80% a été étudiée par **El Euch et al., (2015)**.

La teneur la plus élevée en phénols (305,30 \pm 4,68mg d'équivalent acide gallique (E)/g poids sec (ps) et en flavonoïdes (76,21 \pm 1,26mg de quercétine E/g ps) a été obtenue dans l'extrait de FB, mais les feuilles présentent une quantité de tanins neuf fois plus élevée (56.36 \pm 0,67mg de catéchine E/g ps) et une concentration plus importante d'anthocyanes (0,31 \pm 0,02mg de cyanure-3-glucoside E/g ps).

Il a été constaté que l'extrait de méthanol de FB présentait de meilleures activités antioxydantes. En outre, le FB possédait une activité cytotoxique plus évidente contre les cellules OVCAR et MCF-7. Cependant, les feuilles ont montré des activités inhibitrices plus puissantes envers les acétylcholinestérase.

Les résultats montrent que le facteur organique influence considérablement la composition chimique et les activités biologiques de *C salviifolius* L.

Une recherche a été menée par **Rebaya et al (2016)**, dans le but d'analyser la capacité antioxydante du *Cistus salviifolius* L. tunisien (feuilles et fleurs) et leur composition antioxydante, y compris la teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et proanthocyanidines. Pour cela cinq extraits ont fait l'objet de ces travaux: éthanol, butanol, acétate d'éthyle, dichlorométhane et extrait aqueux, pour trouver de nouvelles sources d'antioxydants.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux et l'extrait alcoolique ont été détectés avec la meilleure capacité antioxydante (CI 50= 2,18 et 3,52 μ g.mL⁻¹). Une relation positive entre l'activité antioxydante (DPPH, ABTS et FRAP) et les composés polyphénoliques des feuilles et des fleurs de *C. salviifolius* testées a été trouvée. Une corrélation linéaire positive élevée a été constatée entre la DPPH et le total des composés phénoliques des fleurs.

La richesse de *C salviifolius* L en antioxydant permet de justifier les utilisations traditionnelles de cette plante dans les traitements des rhumatismes, et des maladies inflammatoires. C'est pourquoi le *C. salviifolius* pourrait être une bonne source d'antioxydant naturel.

Afin de trouver une relation de chémotype entre différentes espèces du genre *Cistus*, **Barrajón-Catalán et al., (2010)** ont effectué une analyse comparative de la composition polyphénolique qualitative et quantitative des parties aériennes de l'espèce de ciste espagnole, la plus répandue dont Treize extraits aqueux dérivés de 10 espèces différentes de *Cistus* ont été analysés par HPLC avec diode.

Trois groupes principaux de composés ont été trouvés, à savoir les ellagitannines, les flavonoïdes et les dérivés d'acides phénoliques.

Le profil polyphénolique était spécifique à chaque espèce, bien que l'abondance de certains composés varie également en fonction du type de sol. Alors que *C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. populifolius* et *C. libanotis* étaient particulièrement riches en ellagitannines, *C. clusii*, *C. laurifolius* et *C. monspeliensis* contenaient des quantités importantes de flavonoïdes et beaucoup moins d'ellagitannins.

Les extraits méthanoliques et hexaniques de *C salviifolius* aient montré une action vasodilatatrice, sachant que l'existence des polyphénols et des flavonoïdes a été prouvée par l'analyse phytochimique des différents extraits obtenus par sonication.

Il a été aussi montré qu'il existe une relation importante entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de ces extraits, qui sont probablement les agents responsables de l'effet vasodilatateur (El yousfi et al., 2020).

Dans leurs travaux, Khalil et al., (2014), ont montré que l'extrait éthanolique de *Cistus salviifolius* L. présentait la zone d'inhibition la plus élevée contre *Agrobacterium tumefaciens* avec 27,35mm de diamètre à une concentration de 15g/100ml.

En Anatolie, l'analyse qualitative et quantitative des extraits méthanoliques de trois espèces de *Cistus* (*C creticus* L., *C laurifolius* L. et *C salviifolius* L.) pour la caractérisation des composés flavonoïdes a été réalisée pour la première fois par RP-HPLC. Le trans-tiliroside, un glucoside mono-coumaroyl kaempférol, s'est révélé être le flavonoïde le plus abondant chez *C. salviifolius* (0,276±0,003g/100 gextract) (Gürbüz et al., 2018).

III.8. Huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L.

La composition des huiles essentielles de quinze populations de *C salviifolius* L. et leur variabilité entre les populations a été étudiée par GC-MS en Grèce par Demetzos et al., (2002).

167 composés ont été identifiés, représentant en moyenne 96 à 100% de la composition de l'huile. Des diterpènes de labdane ont été détectés et identifiés dans les huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L, pour la première fois. Les résultats obtenus à partir de l'analyse des huiles par GC-MS ont été soumis à une analyse en composantes principales. Trois chémotypes principaux (clusters) ont été différenciés.

Le groupe des sesquiterpènes oxygénés a la composition en pourcentage la plus élevée. Toutes les espèces de *Cistus* sécrètent des huiles essentielles en quantités diverses qui sont principalement constituées de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et diterpéniques, mais elles ne sont pas toutes entièrement caractérisées.

Plusieurs espèces de *Ciste* sécrètent également du "labdanum" (Fig.III.6), un exsudat collant qui recouvre les feuilles et les racines, principalement en été, et qui partage la composition terpénoïde avec l'huile essentielle.

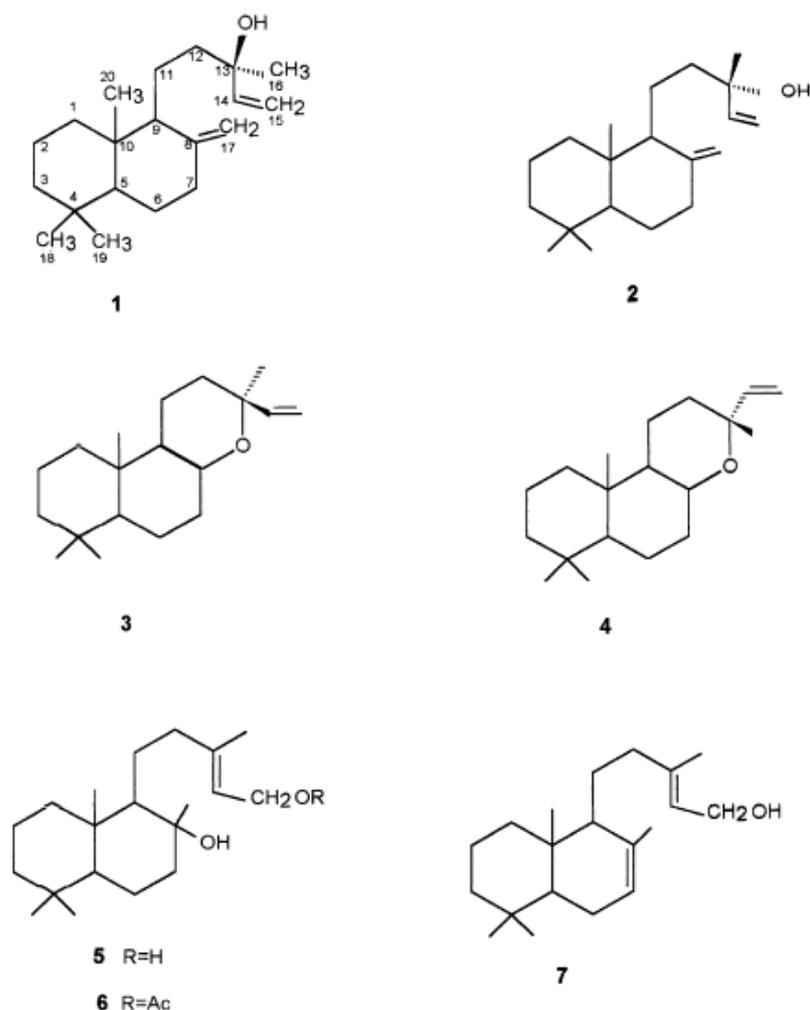


Figure III.6: Structures des diterpènes de type labdane.

1: manool ; 2: 13-epi-manool ; 3: manoyl oxide ; 4: 13-epi-manoyl oxide ; 5: labda-13(E)-en-8 α -15-diol ; 6: labda-13 (E)-en-8 α -15-yl acetate ; 7: labda-7,13 (E)-dien-15-ol. (**Demetzos et al., 2002**).

De nombreuses études ont révélé une importante activité antioxydante et une activité antimicrobienne potentielle des huiles essentielles de *Cistus* contre une grande variété d'infections bactériennes et fongiques, ce qui est probablement dû à la présence de terpènes (**Barrajón-Catalán et al., 2016**)

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes, les pro-anthocyanidines, les terpenoïdes et les tannins (**Bouzerkoune., 2010**).

Dans une première étude traitant la composition chimique du genre *Cistus* en Sardaigne par **Politeo et al., (2018)**, six profils différents ont été démontré, il s'est révélé que les huiles essentielles de *C. salviifolius* et de *C. villosus* ont comme dominants des composés non terpéniques, en particulier des acides non terpéniques et des dérivés, tandis que *C. creticus* et *C. monspeliensis* ont des composés diterpéniques de type labdanien comme composés dominants.

Les huiles de ciste testées ont un large spectre des activités antimicrobiennes qui dépendent de la dose.

Les huiles de *C. salviifolius* L. et de *C. creticus* se sont avérées les plus efficaces, en particulier contre les pellicules de plomb des agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et *Candida albicans*. Ces données présentées dans cette étude ont permis de mettre en évidence des potentiels aromatique des huiles essentielles de ciste pour leur utilisation ultérieure en médecine traditionnelle.

III .9. Toxicité

Certains métabolites secondaires produits par le *Cistus* sp. exercent des effets toxiques sur les mammifères. Les composés les plus toxiques sont l'acide gallique et les tanins, qui sont nocifs pour le foie et les reins. Plusieurs cas de toxicoses mortelles ont été signalés chez le bétail, causés par l'ingestion de *Cistus* sp., dont *C. salviifolius* L (**Yeruham et al., 2002**).

Convulsions et lipofuscinose dans le système nerveux central ont été signalés chez les moutons comme étant directement liés au pâturage sur *Cistus* sp. (**Riet-Correa et al., 2009**). En outre, un extrait de *C. laurifolius* riche en flavonoïdes était responsable d'effets dégénératifs sur le système nerveux périphérique, provoquant un syndrome convulsif chez les souris (**Bregante et al., 1981**).

Comme nous l'avons vu précédemment dans cette section, de nombreux métabolites secondaires produits par *Cistus* sp. sont toxiques et peuvent donc être utilisés à faible concentration pour exercer leurs fonctions biologiques. La consommation directe des plantes ou de leurs extraits (sous forme d'infusion de thé) en plus grande quantité peut devenir nocive et même mortelle.

Chapitre IV :

*Activité antibactérienne
des huiles essentielles.*

IV. Généralités

L'une des principales causes de consultation médicale est l'infection bactérienne, d'où l'importance de l'antibiothérapie, qui est une pratique courante en médecine curative.

En outre, Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques, cependant, l'utilisation de ces derniers de façon incontrôlable peut engendrer une résistance bactérienne à ces derniers.

Actuellement, et en plus de leurs vertus thérapeutiques dans plusieurs domaines (usages religieux, cosmétiques, thérapeutiques, ..), les plantes aromatiques sont utilisées comme un traitement alternatif de l'antibiothérapie pour les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Ces plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes qui constituent essentiellement des huiles essentielles (**Echchaoui., 2018**).

IV.1. Infections bactériennes

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être:

- Locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré;
- Générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme ;
- Focale: c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine. (**Pocidalo et al., 1989 ; Marc et al., 2001**).

IV.1.1. Les toxi-infections alimentaires

Une infection alimentaire ou toxi- infection est une maladie causée par l'ingestion d'aliments ou boissons contaminées par certains agents infectieux ou leurs toxines, représentant un problème courant et croissant de santé publique aussi bien pour les pays industrialisés que pour les pays au cours de développement (**Bouhi et al., 2007**).

Cette contamination peut avoir lieu lors de diverses étapes: de la production jusqu'à la conservation de l'aliment. Si l'infection alimentaire est commune à plusieurs personnes on parle de TIAC c'est à- dire une Toxi-Infection Alimentaire Collective, le plus souvent de type gastro-intestinal dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en générale digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (**Buisson et Teyssou., 2002**).

Les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire. Leur signalement permet de prendre des mesures rapides, en Algérie, la déclaration obligatoire des maladies est régie par l'arrêté N° 179/MS/CAB du 17/11/90 fixant la liste de maladies à déclaration obligatoire et les modifications de notification et la circulaire N° 1126/MS/DP/SDPG du 17/11/90 relative au système de surveillance des maladies transmissibles. Chaque année, le ministère de la santé enregistre entre 4.000 et 5.000 cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), en 2017, plus de 10.000 cas avec six décès. Elles sont définies par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en générale gastro-intestinale (vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, éventuellement sanglante, céphalées, nausées), dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire ou hydrique (**Belabed., 2018**).

IV.1.2. Infection nosocomiale

Les infections nosocomiales ou infections hospitalières sont des infections contractées dans un établissement de santé. Cette définition a été complétée en novembre 2006 et l'infection nosocomiale est désormais intégrée dans l'ensemble des infections associées aux soins (**Descenlos., 2009**) et qu'elle apparait après un délai de 48h après l'admission.

On considère qu'une infection est associée aux soins (IAS) si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente ni en incubation au début de la prise en charge (**Fartoukh et Ricard., 2009**).

Les quatre types d'infections nosocomiales les plus fréquentes sont : urinaires, septicémiques, pneumopathies et celles du site opératoire (**World Health Organization., 2001**).

Pour les infections du site opératoire (ISO), on considère habituellement comme associées aux soins les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention (**Beaucaire., 2001**) ou, s'il y a mise en place d'un implant ou d'une prothèse dans l'année qui suit l'intervention implant (**Bouvet et al., 1989 ; Berche et al., 1991 ; Beaucaire., 1997 ; Popi., 2003**).

Ces derniers posent un véritable problème de santé publique du fait de leur fréquence, leur gravité et aussi de leur coût socio-économique qui représente une charge considérable pour les patients et pour le système de santé (**Haley et al., 1985 ; Vosylius., 2003**).

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp* sont considérés comme ces quatre espèces représentent 56% des microorganismes principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales.

IV.2. Modes de transmission

IV.2.1. Transmission par contact direct ou infections endogènes

Les infections endogènes sont causées par des organismes présents dans la flore normale du patient et du personnel hospitalier. En effet, les mains du personnel peuvent contenir entre 100 à 1000 bactéries/cm² (**Conly et al., 2009**).

IV.2.2. Transmission par contact indirect ou infections exogènes

Les infections exogènes sont celles causées par les appareils médicaux comme le matériel destiné au sondage, aux injections et les instruments de chirurgie.

IV.3. Les antibiotiques

L'avènement de l'antibiothérapie, dans les années 1940, a complètement révolutionné le domaine médical et entraîne une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses (**Avorn et al., 2001**).

IV.3.1. Définition

Un antibiotique (ATB) est une substance antibactérienne d'origine biologique ou de synthèse chimique, qui est capable d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostatique) ou de les détruire (bactéricide), elle agit à de faibles concentrations et n'est pas toxique pour l'hôte (**Mouton et al., 2000**).

Les ATB agissent au niveau de certaines structures ou dans diverses réactions du métabolisme, à un niveau précis, dénommé site d'action ou cible moléculaire, propre à chacun d'eux. Il en résulte que tous les ATB ne sont pas actifs sur tous les agents pathogènes (**Duval et Soussy., 1993**). Certains agissent sur de nombreuses espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif sont dits à «large spectre» ; d'autres agissent sur un nombre beaucoup plus limité d'espèces sont dits à «spectre étroit» (**Singleton., 2005**).

IV.3.2. Antibiotiques naturels et synthétiques et leur mode d'action

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (**Singh et Barrett., 2006**). Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales (**Fig.IV.1**). Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962.

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries.

L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé. (**Guinoiseau., 2010**)

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN, mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (**Tab. IV.1**).

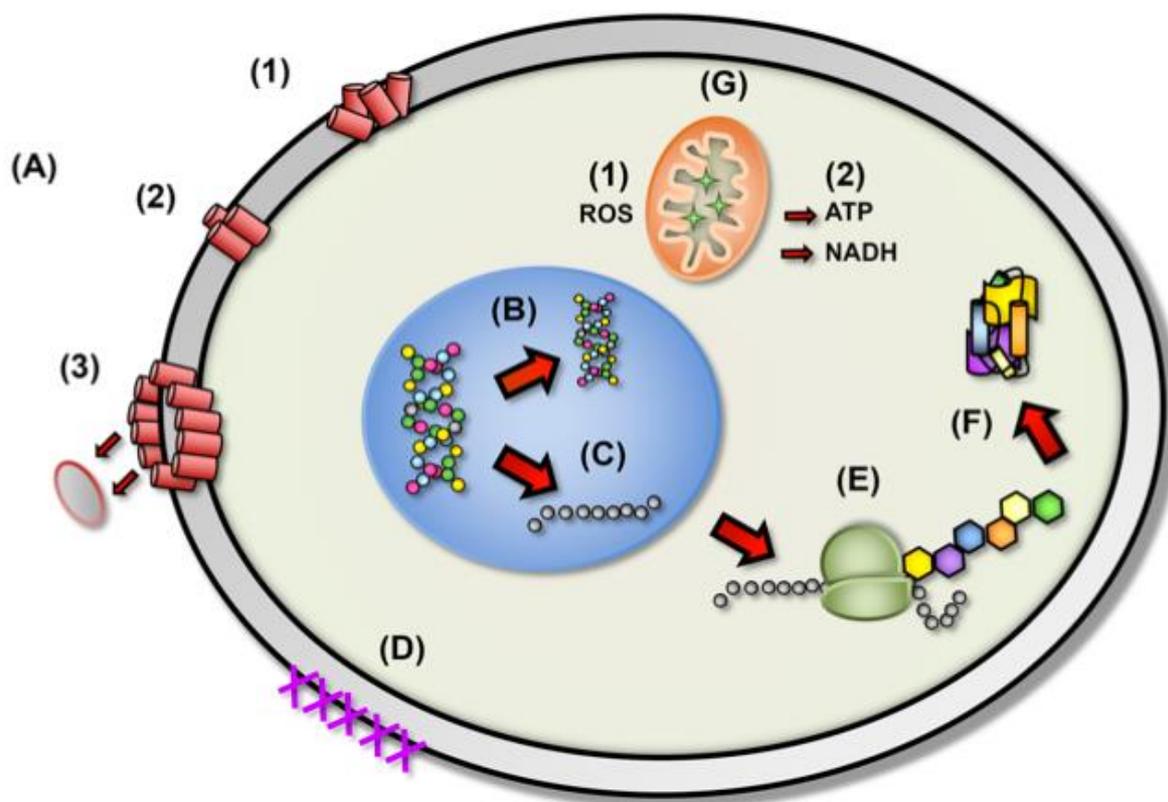


Figure IV.1: Les différents modes d'action des antibiotiques sur les cellules microbiennes.

(Peters *et al.*, 2010).

(A) Perturbation de l'intégrité membranaire : (1) insertion dans la membrane, (2) alignement des séquences hydrophobes, (3) formation de pores.

(B) Inhibition de la synthèse de l'ADN.

(C) Inhibition de la synthèse de l'ARN.

(D) Blocage de la synthèse de la paroi bactérienne.

(E) Inhibition des fonctions ribosomiques et de la synthèse protéique.

(F) Blocage des protéines chaperonnes nécessaires au repliement adéquat des protéines.

(G) Ciblage de la mitochondrie : (1) Blocage de la respiration cellulaire et induction de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, (2) perturbation de l'intégrité membranaire de la paroi de la mitochondrie et de l'efflux de l'ATP et du NADH.

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN, mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens.

Tableau IV.1: Mode d'action des principales classes d'antibiotiques (Singh et Barrett., 2006)

Classe	Origine	Mode d'action	Exemple	Structure chimique
Sulfamides	Synthétique	- Inhibent la synthèse de l'acide folique - Entraînent une diminution de la production	Sulfaméthoxazole	
β -Lactames de 1 ^{ère} génération	<i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Inhibent la synthèse du péptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Pénicilline	
β -Lactames de 2 ^{ème} génération	<i>Cephalosporium</i>		Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Chloramphénicol	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>		Erythromycine	
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	Tétracycline	
Aminoglycosides	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	Streptomycine	
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	

IV.4. Antibiorésistance

Les bactéries, comme tous les organismes vivants, évoluent pour s'adapter aux contraintes environnementales. Parmi ces contraintes, la pression de sélection exercée par les antibiotiques provoque l'émergence de bactéries résistantes, à l'origine d'une situation préoccupante lorsqu'il s'agit de bactéries pathogènes.

Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des Entérobactéries, des *Pseudomonadacés* et des bactéries de la famille des *Acinetobacter* qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (**Chaudhary., 2016**).

Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation suboptimale des antibiotiques au cours des traitements (**Finland., 1979**). Son émergence est due également à l'hospitalisation prolongée, la longue durée des séjours, et les comorbidités, le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux (**Palumbi., 2001**)

En Europe, il s'est démontré que 25000 décès par an sont dus au phénomène de l'antibiorésistance ; le coût annuel avoisinerait les 1,5 milliards d'euros (**Sanders., 2005**). L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne.

Les plantes et leurs dérivés, tels que les huiles essentielles (HE), sont souvent utilisés dans la médecine populaire. Dans la nature, les HEs jouent un rôle important dans la protection des plantes. Elles contiennent une grande variété de métabolites secondaires capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries (**Bouyahya et al., 2017**)

IV.4.1. Résistance naturelle

Il s'agit d'une résistance intrinsèque commune à une population, due principalement à la présence de gènes spécifiques (Allen., 2010).

Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés de manière constitutive ou induits en réagissant à un signal enzymatique généré par un processus d'échappement d'antibiotique (Doyle., 2006).

IV.4.2. Résistance acquise

Les résistances acquises sont à la base de la compréhension de la dissémination des résistances dans des espèces bactériennes différentes.

Elles survient lorsque, seules quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes (Muylaert et Mainil., 2012).

Ce type de résistance est dû à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (Springman *et al.*, 2009).

Les bactéries possèdent différents modes de résistance qui sont regroupés dans la **figureIV.2**

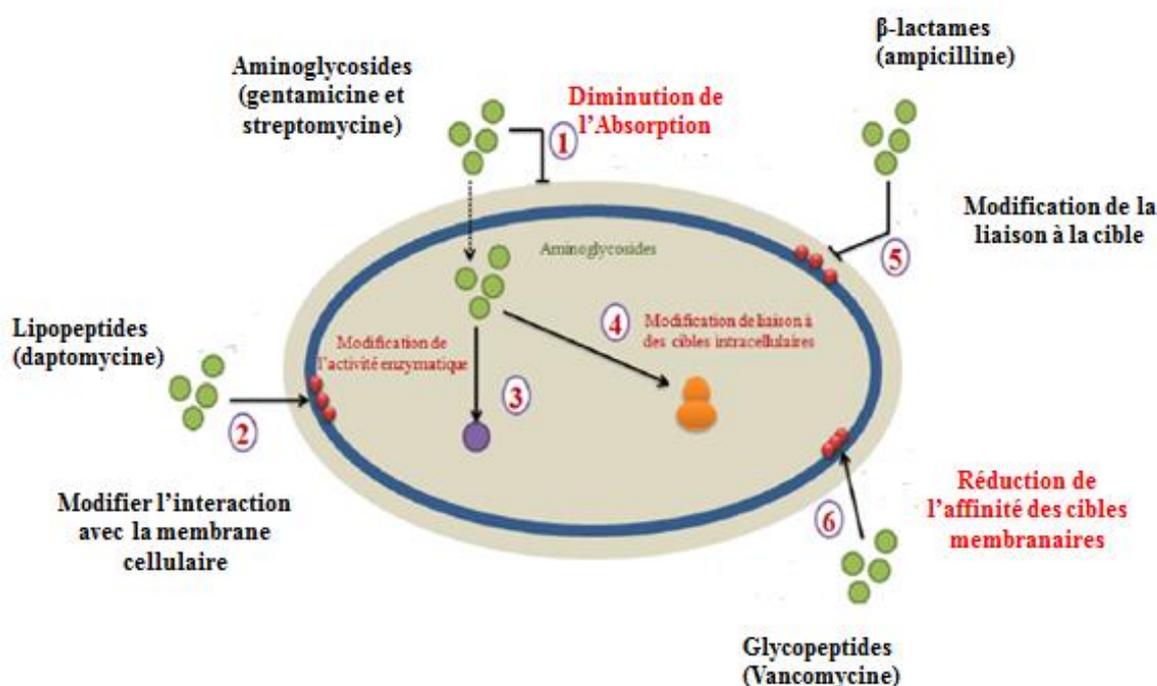


Figure IV.2: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Bouyahya et al., 2017**)

IV.5. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens

C'est en 1875 que Buchholtz a démontré pour la première fois que Les HEs sont douées d'une activité biocide envers les microorganismes (**Pauli et Schilcher., 2010**).

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (**Jones et Dangl., 2006 ; Gibbons., 2008**).

Comme tous les extraits naturels, l'activité antimicrobienne d'HEs dépend de leur composition chimique et la quantité des différents composants.

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules (MM < 500Da) dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. (**Tegos et al., 2002 ; Lewis et Ausubel., 2006**).

De nombreux composés antimicrobiens sont exprimées par les plantes, et d'autres peuvent être synthétisées comme mécanisme d'autodéfense en réponse aux agents pathogènes.

Les légumes, les épices et les fruits à forte teneur en HEs sont d'excellentes sources d'éléments naturels ayant une activité contre les microorganismes d'intérêt agricole et sanitaire **(Rauha et al., 2000)**.

Ces molécules peuvent être naturellement présentes dans la plante sous leur forme active ou peuvent être stimulées par des enzymes spécifiques lorsque l'organisme végétal est soumis à un stress biotique ou abiotique particulier **(Holley et Patel., 2005)**

L'activité antimicrobienne des HEs peut être altérée par des quantités variables de composés spécifiques.

Par exemple, des niveaux élevés d'aldéhyde cinnamique, L'eugénol ou le citrus confèrent des propriétés antimicrobiennes aux HEs. **(Lis-Balchin et Deans., 1998 ; Davidson., 2001)**.

Les HEs de thym, de sauge et de romarin, les monoterpènes et les phénols ont une activité antimicrobienne, antifongique et antivirale importante **(Pina-Vaz et al., 2004 ; Burt., 2004)**.

Certaines HEs, notamment celles que l'on trouve dans le basilic, la sauge, l'hysope, le romarin, l'origan et la marjolaine, sont actives contre *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* et *Salmonella spp.* mais elles sont moins efficaces contre *Pseudomonas spp.* en raison de la formation d'exopolysaccharides qui augmentent la résistance aux HEs **(Burt., 2004; De Martino., 2009)**.

Le mécanisme d'action des HEs dépend de leur composition chimique, et leur activité antimicrobienne n'est pas attribuable à un mécanisme unique mais plutôt à une cascade de réactions impliquant la cellule bactérienne entière **(Burt., 2004)** ; ensemble, ces propriétés sont appelées la "polyvalence des huiles essentielles".**(Fig. IV.3)**.

Les HEs ont pour fonction d'inhiber la croissance des cellules bactériennes et également inhiber la production de métabolites bactériens toxiques. La majorité des HEs ont un effet plus puissant sur les bactéries à Gram positif que sur les espèces à Gram négatif, et cet effet est très probablement dû aux différences de composition des membranes cellulaires **(Marino et al., 2001 ; Cristiani et al., 2007 ; Gutierrez., 2008 ; Chorianopoulos., 2008)**.

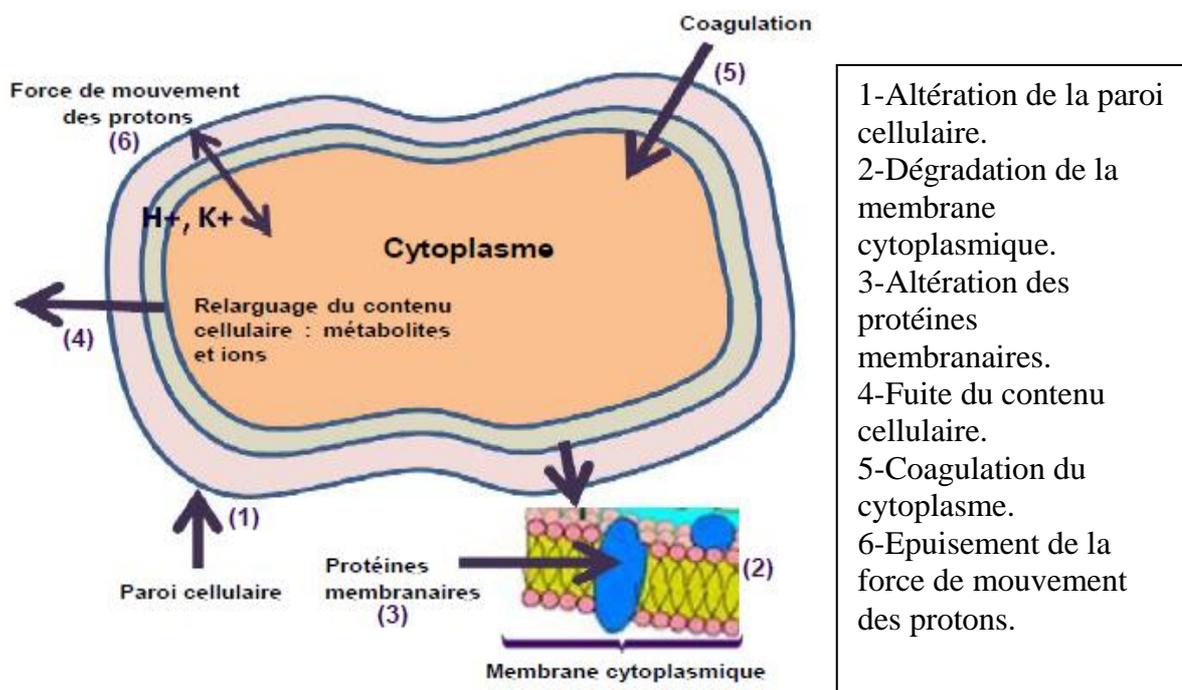


Figure IV.3: Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs (Chenni., 2016).

La barrière de perméabilité fournie par les membranes cellulaires est indispensable à de nombreuses fonctions cellulaires, y compris le maintien de l'état énergétique de la cellule, les processus de transmission d'énergie couplés aux membranes, le transport des solvants et le contrôle métabolique. La membrane cellulaire est également essentielle pour contrôler la pression de turgescence (Poolman *et al.*, 1987 ; Trumpower *et al.*, 1994).

Les effets toxiques sur la structure et la fonction des membranes sont communément utilisés pour décrire l'activité antimicrobienne des HEs (Andrews *et al.*, 1980 ; Knobloch *et al.*, 1988).

En effet, les mécanismes d'action des HEs comprennent la dégradation de la paroi cellulaire (Helander *et al.*, 1998 ; Gill *et al.*, 2006) l'endommagement de la membrane cytoplasmique, la coagulation du cytoplasme (Gustafson *et al.*, 1998 ; Ultee *et al.*, 2000 ; Ultee *et al.*, 2002).

Il s'agit également de l'endommagement des protéines membranaires, l'augmentation de la perméabilité conduisant à la fuite du contenu cellulaire (**Juven et al., 1994 ; Lambert., 2001**), réduisant la force motrice des protons (**Ultee., 2001**), réduisant le pool d'ATP intracellulaire par une diminution de la synthèse de l'ATP, et une augmentation de l'hydrolyse séparée de l'augmentation de la membrane et la réduction du potentiel de la membrane par l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Burt., 2004**).

En particulier les huiles riches en phénols, sont capables d'insérer dans la bicouche de phospholipides des parois cellulaires des bactéries, où elles se fixent aux protéines et les empêchent d'effectuer leurs fonctions (**Juven et al., 1994**).

Dans certains cas, les HEs altèrent souvent la perméabilité des membranes par la destruction du système de transport des électrons (**Tassou et al., 2000**), et un certain nombre de composants des HEs, tels que le carvon, le thymol et le carvacrol, entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP, un événement qui est lié à la destruction de la membrane microbienne (**Helander et al., 1998**).

L'inhibition du transport d'électrons pour la production d'énergie et la perturbation de la force motrice des protons, la translocation des protéines et la synthèse des composants cellulaires sont toutes des changements physiologiques qui peuvent entraîner la lyse et la mort des cellules (**Ben Arfa et al., 2006 ; Turina et al., 2006**).

Chapitre V :

Matériel et Méthodes.

V.1. Présentation de la zone d'étude (Parc national de Theniet El Had)

Le Parc National de Theniet-el-Had (*PNTEH*) représente le plus ancien espace protégé en Algérie, il a été créé le 03 août de l'année 1923, par les autorités françaises pendant la période coloniale. Créé le 23 juillet 1983 par les autorités algériennes, il est devenu le premier Parc National de l'Algérie indépendante. Il portait également le nom de «Paradis des Cèdres» (**Berthonnet., 2010**).

V.1.1. Situation géographique

Le *PNTEH* est situé sur le versant sud de l'Atlas tellien dans le prolongement du massif de l'Ouarsenis (**Loukkas., 2006**). Il se trouve à une cinquantaine de kilomètres du chef-lieu de la wilaya de Tissemsilt et à 147Km de la capitale Alger.

Selon **Meziane (2017)**, il s'étend sur les communes de Theniet El Had et celle de Sidi Boutouchent. Suivant les coordonnées géographiques:

- **Latitude:** 35° 54' 4'' et 35° 49' 41'' de latitude Nord
- **Longitude:** 02° 02' 4'' et 01° 52' 45'' de longitude Est
- **Altitude:** varie entre 858 à 1787m.

A sa création en 1983, le *PNTEH* a eu une superficie de 1500ha (**Berthonnet., 2010**). Actuellement, sa superficie est 3425ha dont 2968ha sont recouvert de végétation (**Loukkas., 2006**).

La flore comprend 450 espèces dont beaucoup sont endémiques à l'Algérie. La strate arborée comprend 1000ha de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*), 1000ha de chêne vert (*Quercus ilex*), 504ha de chêne zéen (*Quercus faginea*), 460ha de chêne liège (*Quercus suber*) et 460ha d'autres espèces (**PNTEH., 2018**).

V.1.2. Caractéristiques climatiques

D'une façon générale, le *PNTEH* se situe dans l'étage bioclimatique subhumide ou humide à hiver froid et ce en fonction de l'altitude ainsi que le versant. La quantité de pluie est irrégulière durant l'année, elle s'élève en moyenne à 792mm (**Loukkas., 2006**).

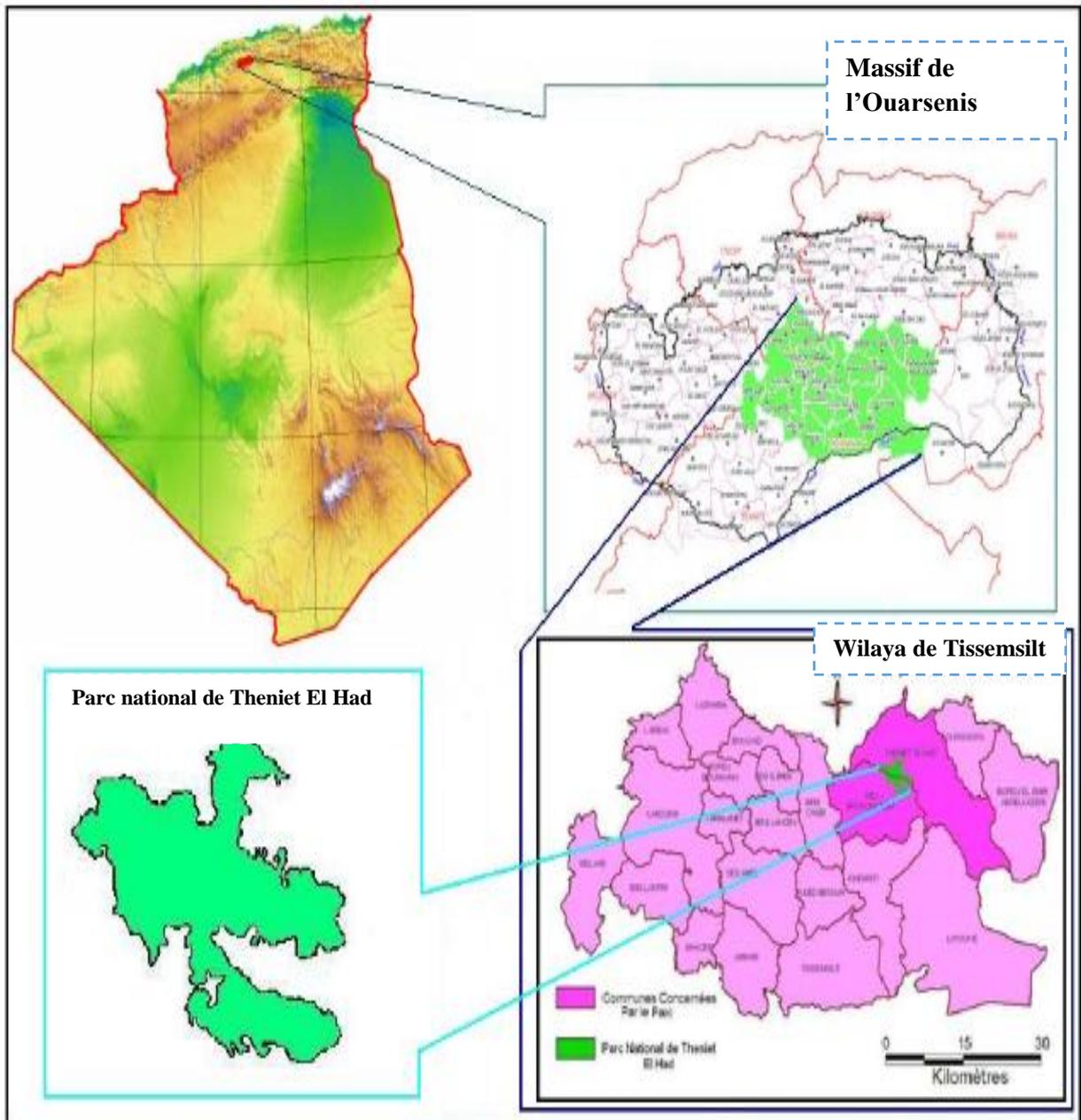


Figure V.1: Situation géographique du parc national de Theniet El Had (Mairif., 2013).

Le parc national de Theniet El Had est divisé en dix cantons, dont la grande partie de superficie se trouve au niveau du versant Sud.

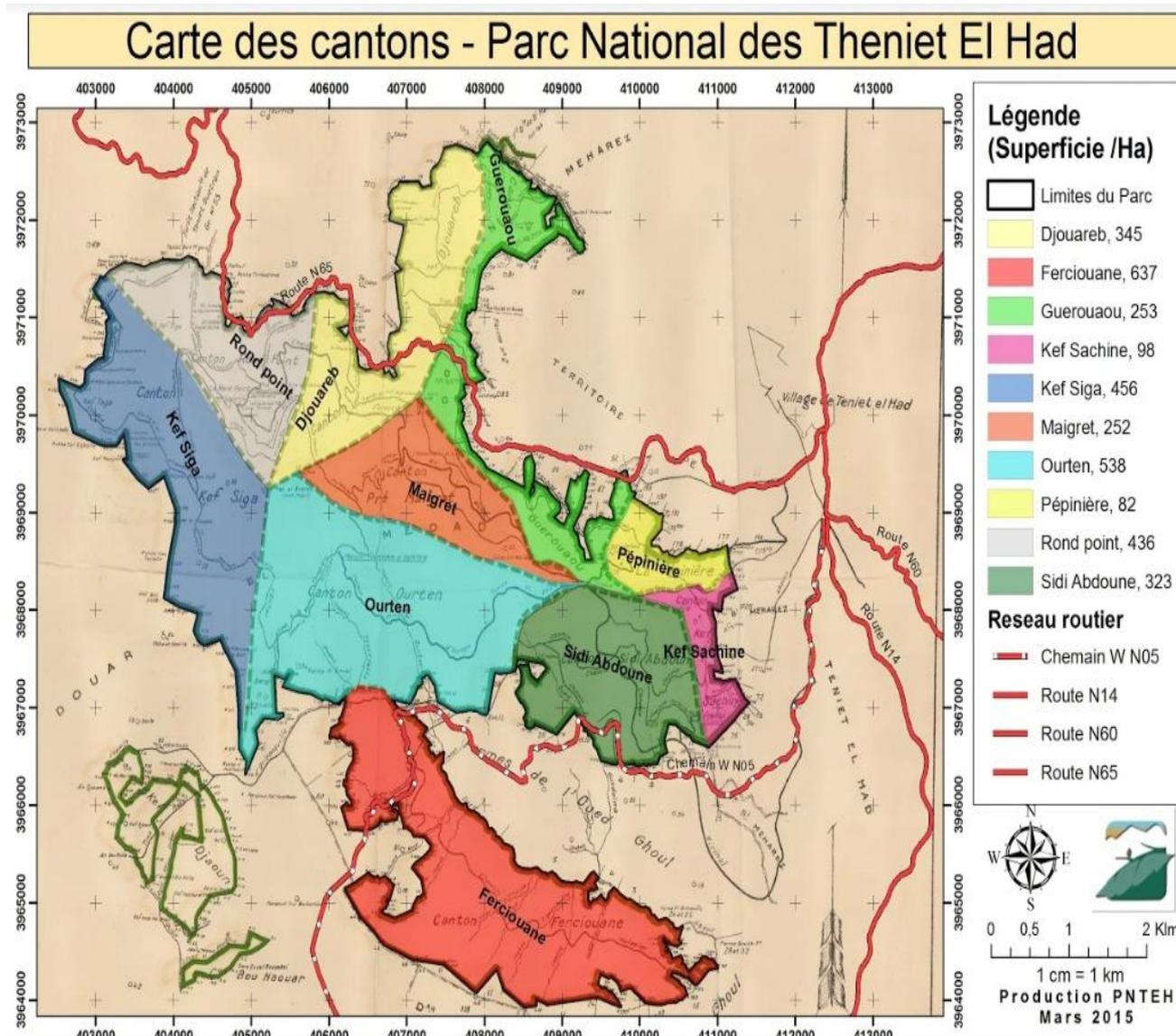


Figure V.2: Carte des cantons - Parc national de Theniet El Had (PNTEH., 2018).

V.2. Matériel végétal

V.2.1. Récolte

Le ciste de feuilles de sauge (*Cistus salviifolius* L.) faisant l'objet de cette étude, est situé dans le canton Rond-point, versant à exposition nord dont les précipitations annuelles totales sont de l'ordre de 792mm (Loukkas., 2006).



Figure V.3: *Cistus salviifolius* L. de Theniet Elhad, Tissemsilt, Algérie.

Les échantillons des parties aériennes (feuilles) de *Cistus salviifolius*.L, ont été identifié par Mr **BELKAID B** au niveau du PNTEH, récoltés au mois de Mai 2017 en pleine inflorescence durant la période matinale vers 11,00 heures. A une température moyenne de 19,9°C.

Le tableau ci-dessous résume des informations sur le site d'échantillonnage.

Tableau V.1: Fiche technique du site d'échantillonnage (PNTEH., 2018).

Canton	Altitude	Exposition	Pente	Type de peuplements	Type de Sol
Rond-point	1200 - 1400 m	Nord	30- 33°	cèdre, Chêne vert, ciste de feuilles de sauge, Chêne liège.	argilo- sableux

V.3. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L.

V.3.1. Extraction par hydrodistillation

V.3.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal a été nettoyé et débarrassé de tous éléments étrangers, placé dans des sacs et transporté au laboratoire.

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Cistus salviifolius* a été effectuée à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**Fig.V.4**), au niveau de laboratoire de technologie alimentaire à Mostaganem, Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 80g de masse végétale séchée dans un ballon en verre de 01 Litre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition (**Duru., 2003**).

L'ensemble est porté à ébullition pendant 03heures à l'aide d'un chauffe-ballon. L'huile essentielle obtenue a été séchée en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). (**Al - Jaber., 2012**).

Puis stockée à l'obscurité à 4°C dans des flacons en verre opaque (**Oke et al., 2009**).



Figure V.4: Dispositif d'hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle

V.3.1.2. Calcul du rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante:

$$y = \frac{V}{W} \times 100$$

y : Le rendement en huile essentielle (% , p/p),

V: Le poids de l'huile extraite (g),

W: Le poids des parties végétales fraîches (g).

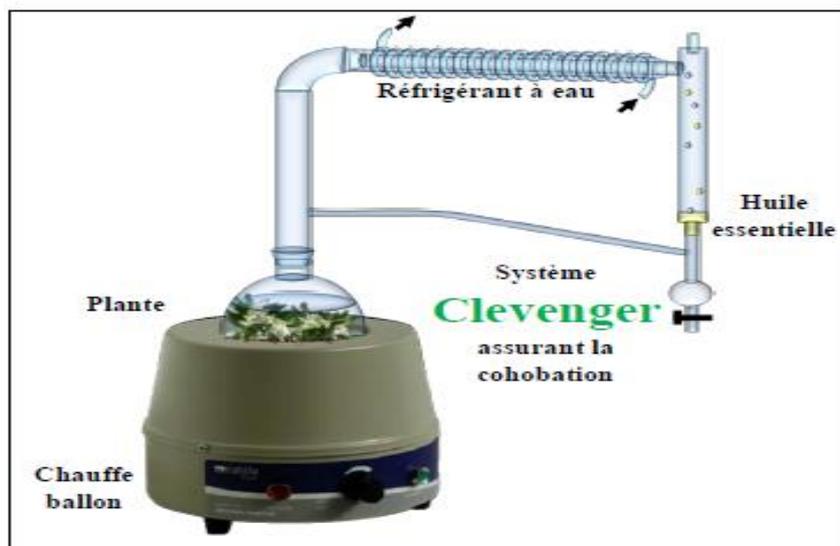


Figure V.5: Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger) (Mengal et Mompon., 1994).

V.4. Méthodes d'étude de l'effet de séchage

Après la récolte de la plante, Les feuilles et les branches ont été nettoyées, purifiées de tout élément étranger la plante est séchée au laboratoire à une température ambiante. L'expérience a lieu en mai 2017. La première extraction est faite sur la plante fraîche, la seconde est réalisée 24 heures plus tard. Les autres extractions sont effectuées pendant un intervalle de 24 heures.

Les huiles essentielles ont été utilisées pour réaliser la suite de l'étude (détermination de la composition chimique et l'activité antimicrobienne).

V.5. Caractérisation chimique des HEs de *Cistus salviifolius* L

L'analyse et l'identification de la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce étudiée ont été effectuées par la technique chromatographique. Il s'agit de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), ce qui nous a permis de séparer, de quantifier et d'identifier les composés en se référant aux banques de données spectrales.

V.5. 1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

L'analyse CG-SM a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse 7890A. (Agilent, américain) équipé d'un spectromètre de masse 5975C Plus (Agilent, américain). au niveau de l'unité de recherche de biologie végétale Université Federico II, Italie

Une technologie Agilent à capillaire de silice fondue HP-5 ms (5% phényl méthyl siloxane) colonne (30m×0,25 mm de diamètre, épaisseur de film 0,1m) a été utilisée pour la séparation. La température de l'injecteur était de 150°C et la température du détecteur était de 250°C

La température initiale a été maintenue à 100°C pendant 4 minutes, et la température a été graduellement augmentée à 130°C à un taux de 5°C /min et de 5°C /min. puis elle a ensuite été tenue pendant 20 minutes à 130°C.

Le gaz porteur était l'hélium avec une vitesse linéaire de 1,2mL min⁻¹ à un rapport de fractionnement de 30:1 ; volume d'injection: 0,2µL

L'identification des différents composés par une comparaison du spectre de masse et des indices de rétention (Ir) des échantillons authentiques avec ceux fournis dans les publications (Adams., 2007). La quantification de la quantité relative de chaque composé a été effectuée en fonction du pourcentage de surface, sans tenir en compte le facteur d'étalonnage.



Figure V.6: Chromatographe en phase gazeuse 7890A.

(Agilent, américain) équipé d'un spectromètre de masse 5975C Plus (Agilent, américain).

V.5. 2. Identification des composés chimiques

L'identification des différents constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la littérature et confirmation par l'Institut national des normes et de la technologie (NIST) V.2.0 Bibliothèque GC-MS (**Babushok et al., 2011**).

V.6. Procédés d'étude microbiologique

V.6.1. Souches microbiennes testées

Pour notre étude, nous avons testé la sensibilité des souches bactériennes de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Alger vis-à-vis des agents antimicrobiens standards (antibiotiques) et biologiques (huiles essentielles). Il s'agit de six souches bactériennes dont trois à coloration de Gram-positive et trois à coloration de Gram-négative (**Tab.V.2**). L'ensemble des souches testées sont connues par leur pouvoir pathogène et d'altération alimentaire, le plus souvent incriminées dans diverses infections et intoxications alimentaires.

Tableau V.2 : Liste des souches microbiennes testées.

Bactérie	Souche	Code	Source
Gram négatif	<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028	Institut Pasteur
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	

V.6.2. Principales caractères des souches testées

V.6.2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus ou «staphylocoque doré» en référence à son aspect en culture (colonies jaunes) représente l'espèce la plus rencontrée en pathologie humaine. C'est une cocci, bactérie Gram positif, aéro-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Elle a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5µm, immobile, asporulé; et habituellement disposé en grappes. (Murray *et al.*, 2003 ; Becker *et al.*, 2004).

elle est présente à plusieurs endroits chez les humains: nez, aine, aisselle, région périnéale (hommes), muqueuse, bouche, glandes mammaires, cheveux, tractus intestinal, appareil génito-urinaire et voies respiratoires supérieures (Spendlove et Fannin., 1983 ; Murray *et al.*, 2003 ; Le Loir *et al.*, 2003).

Selon Nauciel et Vildé., 2005, *Staphylococcus aureus* peut être trouvé chez 30 à 40% des individus particulièrement dans les fosses nasales antérieures et la gorge, il est pathogène et responsable d'infections nosocomiales, cutané, ostéomyélites, septicémies et pneumopathies

V.6.2.2. *Bacillus cereus*

Il s'agit d'un bâtonnet à coloration Gram positive, sporulant et aéro-anaérobie facultatif, appartenant à la famille des *Bacillaceae*, genre *Bacillus* comprenant des bactéries étroitement apparentées qui présentent des propriétés pathogènes très divergentes.

Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles de 1,4µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes (Logan et Rodrigez-Diaz., 2006; Murray *et al.*, 2007).

De nombreuses bactéries classées comme *B. cereus* sont largement répandues dans l'environnement, avec des réservoirs probables dans le sol (Vilas-Boas *et al.*, 2002), et comme habitants commensales des intestins des insectes (Margulis *et al.*, 1998). Elles sont parfois associées à des intoxications alimentaires (Granum et Lund., 1997) et à des infections des tissus mous, notamment de l'œil (Drobniewski *et al.*, 1993).

Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches (From et Rodrigez-Diaz., 2005 ; Logan *et al.*, 2006).

V.6.2.3. *Bacillus subtilis*

Est une espèce de bactéries du genre *Bacillus* et de la famille des *Bacillaceae*. C'est un bacille à Gram-positif groupée en chaîne, mobile, aérobic strict, qui est bien connu pour son capacité à se différencier en spores métaboliquement inactives qui sont très résistantes aux stress environnementaux. (Lopez *et al.*, 2009).

Ces spores lui permettent de survivre longtemps dans des conditions extrêmes telles que la dessiccation, la chaleur ou les radiations. Au cours de l'évolution, sa compétence naturelle lui a également confère une capacité d'adaptation par recombinaison (Marchadier., 2009).

Bacillus subtilis n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme cependant il peut contaminer des aliments en outre il a le pouvoir exceptionnellement de provoquer des intoxications alimentaires. Ce bacille est impliqué dans diverses infections cliniques tel que la méningite, l'infection urinaire, l'endocardite, la pneumonie, la panophtalmie, l'abcès de l'orbite (Devine., 2004 ; Piggot., 2009).

V.6.2.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, radiorésistant appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, *asporulé*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes (Farmer *et al.*, 2007).

E. coli est l'espèce prédominante de la flore aérobic-anaérobic facultative du tube digestif chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales. La combinaison des antigènes de surface, flagellaires et capsulaires déterminent en théorie environ 700 000 *E. coli* différents.

Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces dont une seule, l'*Escherichia coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux (Ishii et Sadowsky., 2008).

La grande majorité des *E. coli* appartiennent à la flore commensale digestive et certains peuvent acquérir des facteurs de virulence particuliers et donner soit des pathologies extra-intestinales (méningites, infections urinaires) soit des pathologies intestinales, telle que les diarrhées (Mariani-Kurkdjian et Bingen., 2012). Cette bactérie est également responsable d'infections communautaires et nosocomiales (Avril *et al.*, 1992 ; Avril et Fauchère., 2002)

V.6.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie à gram négatif de 1 à 5µm de long (Lyczak *et al.*, 2000), se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, très mobiles grâce à une flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvue de spores et de capsules. Elles apparaissent la plupart du temps isolées ou en diplobacilles (Schachter., 1999).

En raison du développement de la pyocyanine, un pigment qui donne aux plaies infectées une couleur bleu-vert caractéristique de *P. aeruginosa*, il est également appelé "bacille pyocyanique".

C'est une bactérie mésophile qui se développe dans une plage de température allant de 4°C à 45°C. La température de croissance optimale varie entre 30°C et 37°C. Elle tolère également des variations du pH dans son environnement.

Cette adaptation à l'environnement (pH, température, substrat) lui permet d'être une bactérie ubiquitaire capable de coloniser différents habitats (sols, eaux douces) ou différents hôtes (végétaux, animaux, nématodes, insectes) (Green *et al.*, 1974 ; Lyczak *et al.*, 2000 ; Filloux et Vallet., 2003).

P.aeruginosa est une des principales causes de nombreuses infections environnementales et nosocomiales (Bonten *et al.*, 1999 ; Pirnay *et al.*, 2003), elle est capable d'infecter différents organes, comme les poumons, le sang, le système urinaire ou encore la cornée dont les principales causes d'infection sont les dispositifs médicaux (cathéter, chambre implantatoire, sonde, intubateur, lentille de contact). (Mulcahy *et al.*, 2014).

Ainsi que l'état de santé du patient (plaies chirurgicales et traumatiques, grands brûlés, dysfonctionnements du système immunitaire) qui peut faciliter l'implantation de la bactérie dans l'organisme et sa multiplication.

V.6.2.6. *Salmonella enterica*

Salmonella enterica est une bactérie gram-négative, en forme de bâtonnet et flagellée qui peut être divisée en 6 sous-espèces différenciables par leurs caractères biochimiques (Grimont., 1992).

Cette bactérie présente un intérêt en raison de sa capacité à provoquer des maladies infectieuses chez les humains et les animaux, l'infection est principalement causée par la

manipulation et la digestion incorrectes des aliments non cuits et un grand nombre de sources alimentaires animales différentes ont été identifiées comme des réservoirs de bactéries (**Humphrey., 2000**).

La salmonellose humaine, infection à *S. enterica*, touche environ 1,3 million de personnes par an, soit environ 30% de toutes les maladies d'origine alimentaire, et cause environ 500 décès. Son coût est estimé à 2,4 milliards de dollars par an (**Callaway et al., 2008**).

Plus de 2 500 Des sérovars de *S. enterica* ont été identifiés et la plupart d'entre eux ont été décrits comme étant la cause d'infections humaines. Toutefois, la plupart des rapports ont mentionné *S. enterica* serovar Typhimurium et *S. enterica* serovar Enteritidis comme étant les causes les plus fréquentes de salmonellose humaine dans le monde (**Galanis et al., 2006; Humphrey., 2000 ; Olsen et al., 2001**).

Les maladies infectieuses causées par *S. enterica* dépendent largement des protéines sécrétées et de l'adhésion des sources fimbriales et non fimbriales pour créer un biofilm et un contact avec la cellule hôte (**Hensel., 2009**). Les cellules bactériennes pénètrent dans les cellules qui tapissent l'intestin, et la membrane de la cellule hôte se froisse en réponse à la fixation initiale des bactéries. Le voltigeur est lié à une réaction de déclenchement qui entraîne la macropinocytose.

En cas de complications abdominales comme la gastro-entérite, lorsque l'équilibre entre l'absorption et la sécrétion est altéré, les premiers symptômes sont des crampes abdominales, de la diarrhée, de la fièvre et des nausées. La plupart des cas causés par une contamination alimentaire se résolvent d'eux-mêmes en une semaine, mais les cas plus graves nécessitent souvent l'administration de fluoroquinolone ou de céphalosporines, deux antibiotiques à large spectre qui peuvent respectivement tuer l'organisme en empêchant la formation de la paroi cellulaire (**CFDCP., 2011**).

V.7. Milieux de culture utilisés

Gélose nutritive et Gélose Mueller Hinton (M.H) (**Annexe 2**) sont les milieux de culture utilisés pour les différents tests microbiologiques.

V.7.1. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)

La suspension est préparée à partir d'une culture jeune en milieu de gélose nutritive de 18 à 24H, où quelques colonies des souches cibles ont été prélevées, diluées dans un tube à essai contenant 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%, puis bien homogénéisées par la suite.



FigureV.7: Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne a été par la suite standardisée à 0.5McF (McFarland), soit une Densité Optique de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625nm sur un spectrophotomètre UV (Jenway 670).

V.8. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

(Antibiogramme)

V.8.1. Principe

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques.

Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise. (**Labiou., 2016**)

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique.

La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide par la méthode de disque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM., 2012**). Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (**François., 2000**). Les antibiotiques testés sont montrés dans le **tableau V.3**.

➤ **Ensemencement**

Après avoir introduit un écouvillon stérile dans l'inoculum ajuste au témoin d'opacité standard, on rejeter l'excès de bouillon par pression sur les parois du tube. Ensemencer la gélose. L'écouvillon doit passer 2 à 3 fois sur toute la surface en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne répartition de l'inoculum. puis laisser sécher 10 à 15min à la température ambiante (Denis *et al.*, 2011).

➤ **Dépôt des disques et incubation**

On pose les disques d'antibiotiques correspondants en appuyant légèrement pour qu'ils adhèrent bien à la gélose. Les disposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de milieu à 15 mm minimum de la périphérie de la boîte de manière à ce que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

Les boîtes de Pétri ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1H. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 24 à 48H (Fig.V.9).

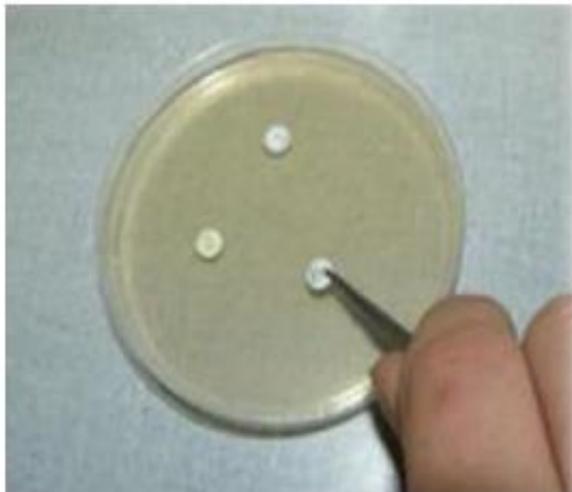


Figure V.8: Dépôt des disques



Figure V.9: Incubation 24H à 37°C

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque ou aucune croissance n'est observée.

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes, ce qui permet de classer la bactérie dans l'une des catégories; sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I). selon la standardisation nationale de l'antibiogramme en médecine humaine et vétérinaire de l'année 2011 et le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2015) (Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015).

Tableau V.3: Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme
(Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015)

Antibiotique	Sigle	Charge du disque en μg
Amikacine	AK	30
Gentamycine	CN	15
Tobramycine	TMN	10
Sulfaméthoxazole-Trimethoprim	SXT	25
Fosfomycine	FF	50
Ampicilline	AM	10
Amoxicilline	AML	25
Ticarcyline	TI	75
Ceftazidime	CAZ	30
Kanamycine	K	30
Colistine	COL	10
Rifampicine	RA	5
Pristinamycine	RP	15

V.9. Etude du comportement des souches bactérienne vis-à-vis les principes actifs des huiles essentielles

V.9.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle (**Vincent., 1991**). plus précisément d'un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de sélectionner plus précisément les huiles essentielles capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (**Damian et Damian., 1995**).

Différents types d'aromatogrammes, des milieux solides, liquides, sont exploitables. Cependant, dans la pratique quotidienne, le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (**Pibiri., 2005**).

V.9.1.1. Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose (**Hazzit et al., 2009**). On prépare des boîtes de pétri (90 mm de diamètre) en versant 20ml de milieu Agar Mueller Hinton (MHA) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes.

Entre-temps, la densité des suspensions bactériennes a été ajustée par l'eau physiologique stérile en utilisant un spectrophotomètre UV (Jenway 670) pour atteindre la concentration finale de 10^6 UFC/ml (**Mohapatra et al., 2011**). Un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement et étendu uniformément sur la gélose (MH) et laissé sécher pendant 5min.

Des disques stériles de papier Wattman de 6mm de diamètre, contenant 10 μ l d'huile essentielle pure, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des boîtes ensemencées (un disque par boîte).

Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15min à température ambiante puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Trois essais sont réalisés pour chaque test avec témoins utilisés comme contrôle négatif.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse. Le résultat étant la moyenne des trois essais et peut être symbolisé par des signes selon la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles (**Ponce et al., 2003**) (**Fig.V.10**).

- Non sensible (-) ou résistante (R): diamètre < 8mm
- Sensible (+) diamètre compris entre 9 à 14mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm

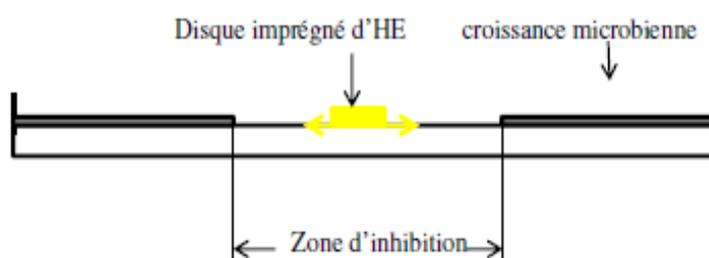


Figure V.10: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme

V.9.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Sur la base des résultats, la concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'huile qui est corrélée à une absence de croissance (**Joffin., 1996**).

Selon **Skandamis et Nychas., (2001)**. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne de 90% (**Benchikh., 2017**)

Pour déterminer les CMI (concentration minimale inhibitrice), nous avons suivi les mêmes étapes que pour l'évaluation de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé, en variant les concentrations des huiles essentielles.

Cette détermination a été réalisée en milieu solide selon la méthode rapportée par **Remmal et al., (1993)** et **Farah et al., (2001)**.

L'huile essentielle est émulsionnée à raison de 10% (DMSO) afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés.

Les dilutions ont été préparées à 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 et 1/500 dans la solution de DMSO (**Fig.V.11**). Un volume de 1,5ml de chacune des dilutions est versé dans une boîte de Pétri vide, est ajouté par la suite 13,5ml du milieu MH préalablement stérilisé pendant 20 minutes à 120°C, refroidie à 45°C, et on fait tourner les boîtes d'un mouvement circulaire jusqu'à obtention d'un milieu homogène. Les concentrations finales d'huiles essentielles sont de l'ordre de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000 et 1/5000 (v/v) (**Tab.V.4**). Des contrôles négatifs (témoins), ne contenant que le milieu de culture et le DMSO ont été également préparés. (Chaque test est réalisé en triplé).

Les boîtes préparées font l'objet d'un ensemencement des bactéries testées à l'aide d'une anse calibrée de 1µl (dont la densité des suspensions est ajustée de la même manière). Après incubation à 37°C pendant 24-48h.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation et la CMI correspond à la plus faible concentration d'huile à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible (**CLSI, 2002 ; Oussou et al., 2004**).

Tableau V.4: Concentrations finales des huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	témoin
Huile essentielle (µl)	150	60	30	15	7.5	5	3.75	3	0
D.M.S.O (µl)	1350	1440	1470	1448.5	1492.5	1495	1496.25	1497	1500
Concentrations (v/v)	1/10	1/25	1/50	1/100	1/200	1/300	1/400	1/500	0
Gélose MH coulé (µl)	13500								
Concentrations finales (v/v)	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	0

1/10 HE+ 9/10 DMSO

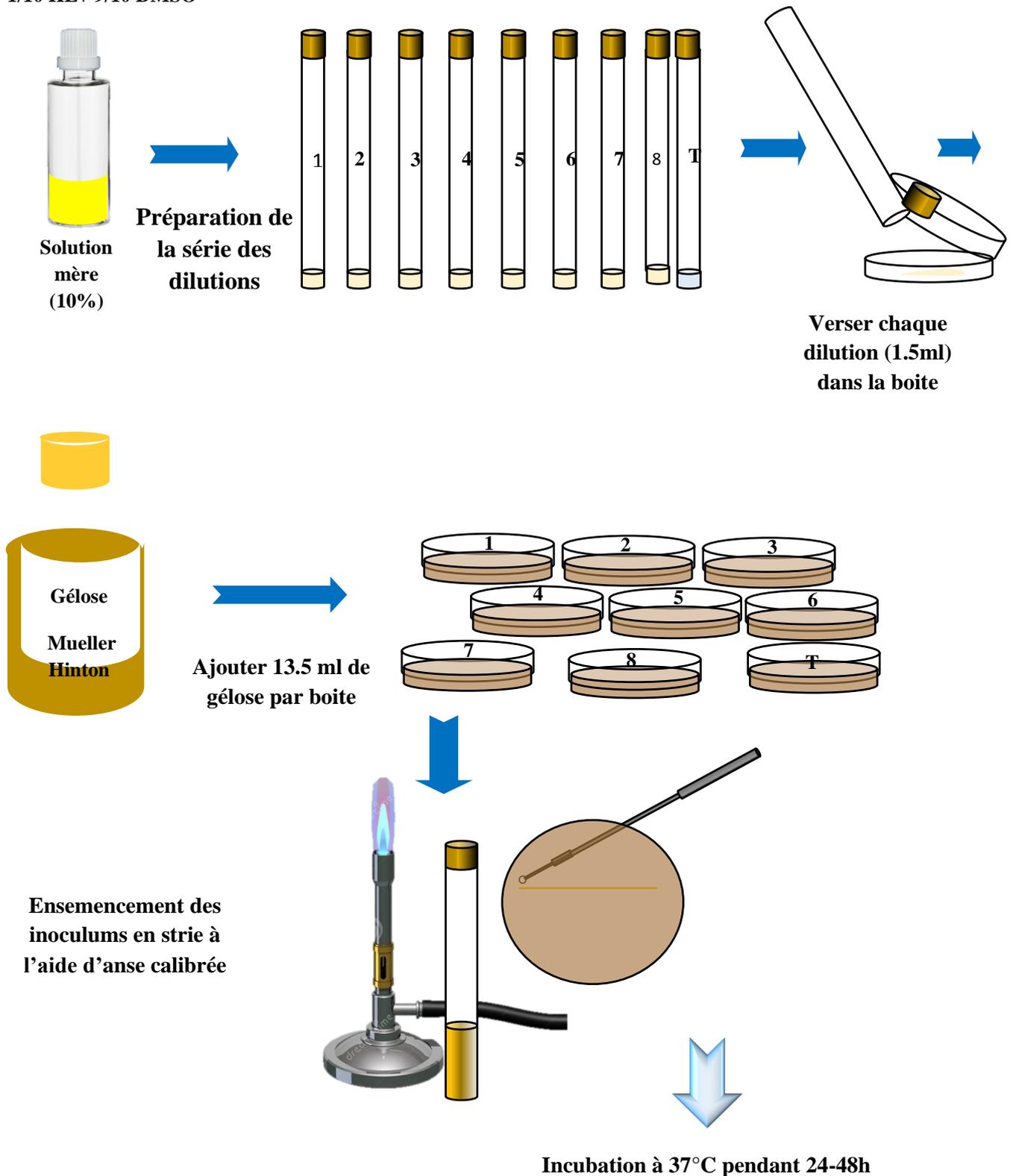


Figure V.11: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L.

Chapitre VI :

Résultats et discussion

VI.1. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles de *Cistus salviifolius* L.

VI.1.1. Extraction des huiles essentielles

VI.1.1.1. Rendement d'extraction

Les huiles essentielles ont été extraites par la technique d'hydrodistillation, dont les principales caractéristiques organoleptiques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI.1. Propriétés organoleptiques de l'HE de *Cistus salviifolius* L.

Paramètres	HEs de <i>C salviifolius</i> L.
Aspect	liquide
Couleur	jaune clair
Odeur	forte et persistante

Les quantités d'huile essentielle ont été obtenues pour chaque essai, après 3 heures d'hydrodistillation de 80g de matière végétale, ce qui a permis de calculer le rendement (R) de l'extraction selon la formule ci-dessous (**Putri et al., 2017**).

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

Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne (feuilles) de *Cistus salviifolius* L. est de l'ordre de 0,070 %. Dans des études similaires rapportées par **Demetzos et al., (2002)** en Grèce, **Loizzo et al., (2013)** sur des plantes poussant en Sicile (Italie) et **Fanourioua et al., (2018)** en Turquie, les rendements moyens en huiles essentielles enregistrés étaient de l'ordre de 0.074, 0.15, et 0.07% respectivement.

Cependant la valeur du rendement que nous avons obtenu est inférieure à celle obtenue par **Mastino et al. (2016)**, en Sardaigne soit 1.36% et celles rapportées par **Demetzos et al., (2002)** dans une étude sur 15 populations de la même espèce et dans la même région, se situant respectivement entre 0,1 et 0,44%

En Algérie, les études sur les huiles essentielles de *C salviifolius* L. demeurent peu fréquentes, néanmoins, **Bechlaghem et al., (2019)** ont, suite à une étude menée sur trois

autres espèces de cistes dont *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis* poussant dans le nord-ouest de l'Algérie, obtenu des rendements en huiles essentielles extraites des parties aériennes fraîches (feuilles, fleurs, tiges), de l'ordre de 0.08, 0.02 et 0.003 respectivement.

On peut déduire que le rendement en huile essentielle d'un même genre ou d'une même espèce peut varier en fonction de plusieurs facteurs, parmi lesquels l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques tels que la température et l'humidité, le stade de croissance, la conservation du matériel végétal, la méthode d'extraction ainsi que la génétique de la plante (Vekiari et al., 2002 ; khajeh et al., 2005 ; Viljoen et al., 2006 ; Sefidkon et al., 2007 ; Kelen et Tepe., 2008).

D'autres facteurs tels que la lumière stimulent aussi la production des huiles essentielles. Des études sur *Mentha piperita* L. ont montré que l'obscurité tend à diminuer le rendement en huiles volatiles de 1.43% à 1.09 %. De même, le pourcentage du menthol dans l'huile essentielle chute de 61.8 % à 57.5 %. Il en est de même pour l'irrigation qui exerce un effet positif sur la croissance végétative. Il a été démontré que le manque ou l'excès d'eau ont un effet défavorable sur le rendement des huiles essentielles. (ElZakhem., 2003).

Dans une autre étude, une expérience menée au Brésil concernant l'impact des différents environnements lumineux sur les huiles essentielles des feuilles de poivre de singe (*Piper aduncum* L.) a révélé des différences importantes dans les rendements et les caractéristiques chimiques des huiles essentielles lorsque la plante est cultivée dans des conditions de lumière différentes. Ainsi les plantes à feuilles poussant dans des conditions de faible luminosité et dans un environnement dominé par une plus grande quantité de lumière bleue procuraient une production d'huiles essentielles plus élevée.

Par ailleurs, la plupart de la production d'huile essentielle a été observée dans des racines où l'influence de la lumière n'était pas présente (Pacheco et al., 2016).

La teneur en huiles essentielles dépend également de la date de récolte. Les bourgeons et les feuilles doivent être récoltés avant la floraison. En effet, selon Salle et Pelletier., (1991), après la floraison, 70% des huiles essentielles s'évaporent dans l'air. Selon Flück., (1942), la plante entière est généralement récoltée pendant la floraison.

Par ailleurs, Okoh et al., (2007), ont montré que le rendement maximal en huiles essentielles est obtenu au stade de pleine floraison (0,97%), contrairement au stade de la pré-floraison où le rendement est à son minimum (0,13%).

VI.1.1.2. Effet de la période de séchage sur le rendement en huiles essentielles

D'après les résultats mentionnés dans la **Fig.VI.2**, on remarque clairement l'effet du séchage sur le rendement d'extraction des huiles essentielles. En effet, les rendements d'extraction de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* subissent une variation notable en fonction du temps de séchage de la matière végétale. C'est ainsi qu'à l'état frais, le rendement est de l'ordre de 0,038% et passe à 0,04% après 48 heures de séchage. Par ailleurs, le rendement maximal en huiles essentielles de la partie aérienne de *C. salviifolius* L. de l'ordre de 0,07% est atteint au cours du troisième jour de séchage, suivi par une baisse dans les jours qui suivent.

Il apparaît ainsi que le séchage influe sur le rendement en huiles essentielles de la plante avant sa mise en distillation et plusieurs travaux de recherche ont confirmé ce phénomène.

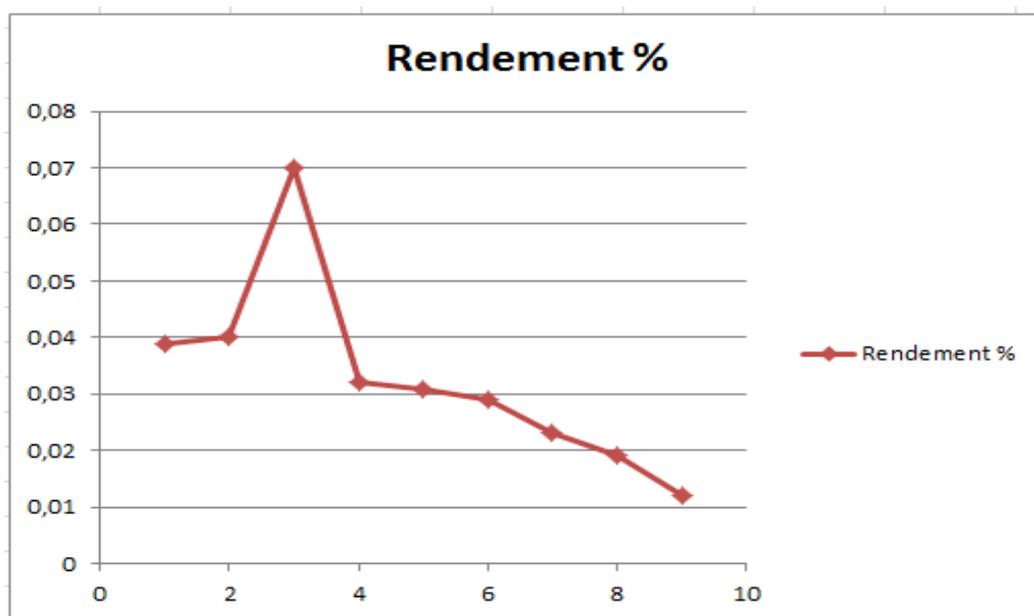


Figure VI.1: Variation du rendement des huiles essentielles de la plante *Cistus salviifolius* L. au cours de la période de séchage.

Le rendement augmente d'abord jusqu'à atteindre un équilibre puis diminue dans le sens de l'évolution de la teneur en eau ou la perte de poids pendant le séchage et par conséquent du rendement.

D'après **Asekun et al., (2007)**, la teneur en huiles essentielles des feuilles séchées de *Mentha longifolia* est plus importante que la matière en feuilles fraîches. La rentabilité de la plante séchée étant plus élevée en terme de rendement de l'ordre de 0,592% par rapport à la plante fraîche soit 0,136% (**Mastino et al., 2017**).

Plusieurs études ont été entreprises à ce sujet, et une tendance générale a été vérifiée. Le rendement en huile essentielle exprimé par rapport à la matière sèche, varie avant la distillation pendant le séchage de la matière végétale. C'est ainsi qu'il débute progressivement dans une première phase par une nette élévation, atteint un maximum, puis s'abaisse régulièrement.

Le niveau du rendement optimal et la durée de la première phase sont en relation avec l'espèce végétale et les conditions de séchage mises en œuvre (séchage direct au soleil ou naturel à l'air). Cette constatation a été confirmée pour *Teucrium polium* (**Bencheikh et al., 2015**), la verveine (**Edwardien et al., 1993**), l'eucalyptus (**Zrira et al., 1991 ; Zrira., 1992**), la lavande (**Raiss., 1998 ; Valnet., 2003**), et la tanaïs annuelle (**Elamrani et al., 1997 ; Greche., 1999**).

En outre, la même observation sur le romarin a été confirmée par **Elamrani et al., 1997 ; Amrani., 1999**.

Au Maroc, une seule espèce a défié cette loi, au cours d'un travail mené sur ce thème au niveau des laboratoires des plantes aromatiques où le rendement en huiles essentielles a demeuré constant pendant plusieurs semaines (**M'Rabet., 1999**).

Néanmoins, le temps de séchage du matériel végétal n'affecte en aucun cas la composition qualitative de l'huile essentielle, cette constatation a été confirmée pour l'espèce *Artemisia herba-alba* Asso par **Mighri et al., (2009)**.

Par contre, une recherche menée par **Essaqui et al., (2016)** a montré que le temps de séchage au soleil et à l'ombre d'*Warionia saharae* exerce une variation assez importante sur le rendement en huiles essentielles et affecte les constituants qualitatifs et quantitatifs de leur composition.

Dans la recherche de la compréhension de ce phénomène et après avoir vérifié plusieurs hypothèses, il a été montré qu'il s'agit d'un phénomène biologique étant donné que la plante, après sa récolte continue à vivre et la biosynthèse des huiles essentielles continue et s'accélère, ce qui est à l'origine de l'accentuation de son activité de biosynthèse des terpènes et dérivés. Il s'agit pour la plante d'un moyen de défense contre le stress hydrique (**Zrira et**

al., 1991), c'est ce qui est à l'origine de l'augmentation des rendements en huiles essentielles pendant les premières phases.

Après la mort définitive de la plante, toute l'activité de biosynthèse s'arrête et les pertes d'huiles essentielles par évaporation ne sont plus compensées, d'où les baisses des rendements de distillation à cause de la réduction ou l'arrêt de l'activité enzymatique causant la mort des cellules suite à une forte déshydratation. De ce fait, on peut considérer le séchage comme étant la méthode la plus courante et la plus fondamentale pour la conservation des plantes médicinales après leur récolte (Muller et Heindl., 2006).

Tanko et *al.*, (2005), ont rapporté que les plantes fraîchement récoltées occupent de grands volumes et posent des difficultés de transport et de stockage. Par conséquent, le séchage des plantes médicinales est nécessaire pour la manipulation et la conservation, mais les protocoles de séchage doivent être conçus de telle sorte qu'ils n'entraînent pas la diminution des concentrations phytochimiques.

Suite à ces résultats, pour une exploitation industrielle, il est impératif donc d'extraire l'huile essentielle des feuilles de *C. salviifolius* L. environ trois jours après la récolte, puisque la teneur en huiles essentielles est à son maximum. Au-delà de cette période, elles perdent quantitativement leurs huiles essentielles.

VI.1.2. Détermination de la composition chimique de l'HE de *Cistus salviifolius* L.

L'analyse GC-MS de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. a permis de détecter 39 composants (Tab.VI.2).

Tableau VI.2: Composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L.

N°	RI	Composants	%
1	1100	nonanal	0.7
2	1143	Camphor	13.2
3	1165	neo-mentho	0.4
4	1183	1- α -terpineol	0.7
5	1290	thymol	0.4
6	1298	carvacrol	0.5
7	1351	iso-neocarvomenthylAcetate	0.9
8	1395	Trimnal	1.8
9	1401	methyleugenol	0.5
10	1453	geranylacetone	0.3
11	1460	cis-muuro-la-4(14),5- diene	0.2
12	1461	allo-aromadendrene	0.1
13	1495	α -muurolene	0.2
14	1513	γ -cadinene	0.1
15	1532	cadina-1,4-diene	0.2
16	1549	elemol	0.3
17	1584	β -copaen-4-ol	1.0
18	1581	caryophylleneoxide	4.4
19	1590	Viridifloro	0.1
20	1592	longiborneol	3.2
21	1573	dodecanoicacid	1.31
22	1627	epi-cubenol	0.5
23	1641	α - epi-muurolol	1.8
24	1645	α -muurolol	0.6
25	1652	α -eudesmol	4.1
26	1653	α -cadinol	1.3
27	1649	β -eudesmol	0.9
28	1676	n-tetradecanol	0.5
29	1762	benzyl benzoate	1.2
30	1777	tetradecanoicacid	3.4
31	1978	ethylhexadecanoate	5.6
32	2090	Octadecanol	0.2
33	2100	heneicosane	0.8
34	2200	N-docosane	3.2
35	2259	epidehydroabietol	3.2
36	2271	3 β -hydroxy- manoyloxisomer	1.3
37	2325	trans-ferruginol	10.6
38	2357	trans-ferruginylacetate	2.7
39	2278	Cis- totarol	2.8

Les résultats de l'analyse qualitative des huiles essentielles montrent que les sesquiterpènes oxygénés ont été détectés dans des pourcentages plus élevés soit (30.76%) représentés essentiellement par le caryophyllène oxide (4.4%) et l' α -eudesmol (4.1%), suivi par les monoterpènes oxygénés avec un taux de 17.94%.

Parmi les autres composés, on retrouve les sesquiterpéniques hydrocarbonés, les esters, les diterpènes principalement avec un pourcentage équivalent de 12.82%, dont les constituants majoritaires sont cadina-1,4-diene (0.2%), trimnal (1.8%), trans-ferruginol (10.6%), ethylhexadecanoate (5.6%) (Fig.VI.2).

Les structures chimiques des composants majoritaires de l'HE sont représentées dans la figure VI.3.

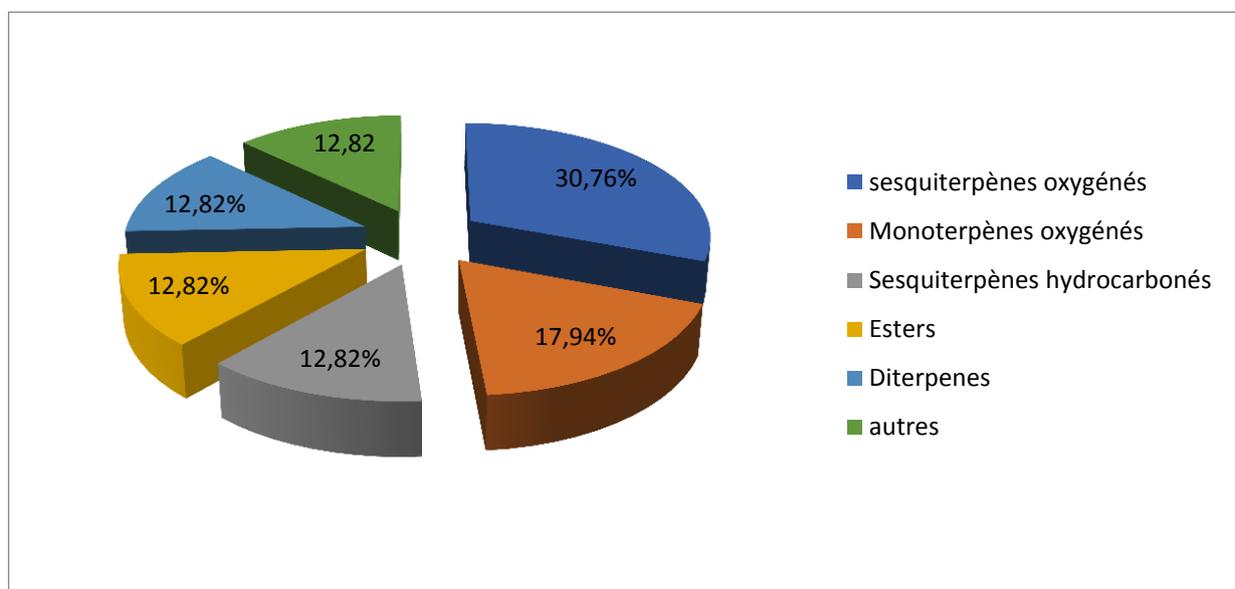


Figure VI.2: Proportions des différents groupes chimiques de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L.

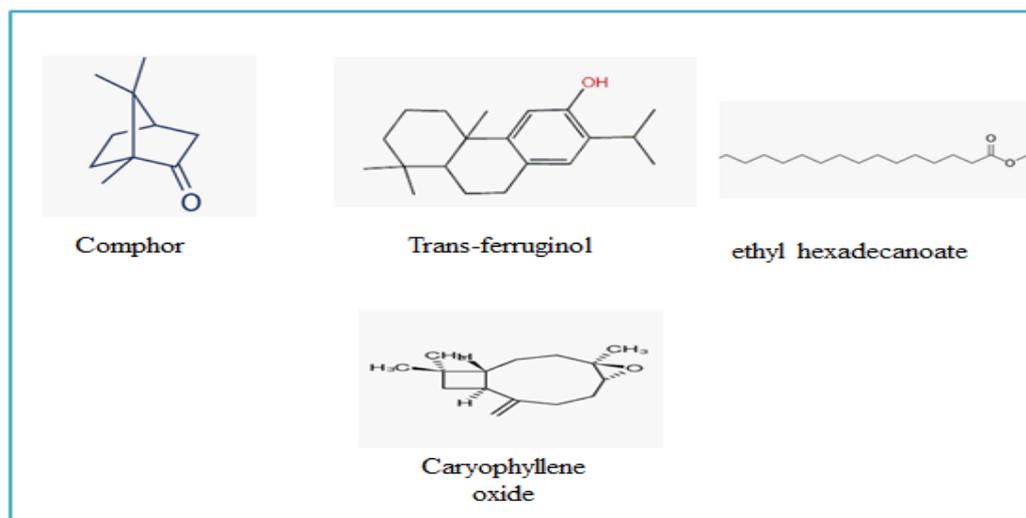


Figure VI.3: Structure chimique des composants majoritaire de l'HE de *Cistus salviifolius* L.

De nombreuses études dont celle menée en Tunisie par **Loizzo et al., (2013)** a montré la richesse de l'huile essentielle en sesquiterpènes (hydrocarbures 12,5% et oxygénés 31,5%) avec un profil assez complexe. Parmi les sesquiterpènes, le principal composé était le germacrène D (9,1%). Par ailleurs **Demetzos et al., (2002)** en Grèce, rapportent que les huiles essentielles étaient caractérisées par des pourcentages élevés de sesquiterpènes, en particulier de sesquiterpènes oxygénés. La même constatation a été rapportée par **Pistelli et al., (2018)**, qui ont signalé une teneur plus élevée en sesquiterpènes oxygénés (38,1%) dans la composition chimique des huiles essentielles de trois espèces spontanées de *C. salviifolius* dans une mine abandonnée de l'île d'Elbe et moins de non-terpènes (16,5%, NT) par rapport à l'échantillon prélevé.

Dans d'autres travaux, 53 composants (soit 81,27% de l'huile) ont été détectés dans l'HE de la même plante en Sardaigne (**Mastino et al., 2017**). Les mêmes auteurs ont rapporté une teneur élevée en denorisoprénoïdes (10,44%), soient des métabolites similaires à ceux qui sont identifiés dans des populations crétoises. L'analyse de l'huile essentielle de feuilles de cette plante a permis d'identifier l'acide pentadécanoïque et l'acide hexadécanoïque comme composés majoritaires avec un pourcentage de 18,1%, 14,1% respectivement (**Politeo., 2018**).

En Espagne, et dans le but de fournir une caractérisation complète du profil volatil de différentes plantes de *Cistus* cultivées, un système combinant la micro-extraction en phase

solide et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-SPME-GC-MS) a mis en évidence la présence abondante du camphre (43.86%) (**Aránzazu., 2015**).

Par comparaison avec de nombreuses espèces de *C. salviifolius* L. étudiées, nos résultats ne se conforment pas à la composition de l'huile essentielle d'une population étudiée par **Demetzos et al (2002)**, où les monoterpènes oxygénés ont été détectés avec des pourcentages plus élevés que les hydrocarbures monoterpéniques.

Cette composition n'était pas la même chez d'autres espèces du même genre *Cistus* où les composés comme l' α -pinène, le β -pinène et le γ -terpinène représentent le pourcentage majeur (**Robles et al., 2003**).

Il est à signaler que non seulement entre deux genres, mais aussi dans le même genre récolté dans deux régions différentes, la composition chimique des huiles essentielles des différentes espèces de *C salviifolius* L. diffère.

Cette variation du point de vue qualitatif et quantitatif peut être due à de nombreux facteurs. Des travaux de recherche ont montré que la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, durée totale de l'insolation, maturité, sol, climat, etc..).

En revanche, des facteurs technologiques peuvent aussi affecter les variations qualitatives et quantitatives rencontrées dans les huiles essentielles tels que le mode de culture ou d'extraction d'huile essentielle de la plante (**Lopes et al., 1997 ; Vasconcelos et al., 1999 ; Bruneton., 1999**).

Il s'est démontré que les stress biotiques et abiotiques et tous ces facteurs exercent une influence considérable sur la production de plusieurs métabolites secondaires des plantes et avoir des conséquences sur la proportion relative des principaux composés caractéristiques). Et tous ces facteurs peuvent influencer les voies de biosynthèse des plantes et avoir des conséquences sur la proportion relative des principaux composés caractéristiques (**Jaleel et al., 2008 ; Ennajar et al., 2009; Oliva et al., 2010 ; Viuda-Martos et al., 2011**).

VI.2. Etude de l'activité antimicrobienne

VI.2.1. l'Antibiogramme

Les résultats obtenus après incubation à 37°C pendant 24-48 heures sont indiqués dans le **tableau VI.3**

Tableau VI.3: Résultats de l'antibiogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)

Antibiotique	Diamètre critique			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	R	I	S						
AK	≤15	15-17	≥18	23.60	0	19.40	11.23	6.10	24.7
CN	<16		>16	21.33	-	17.50	22.33	9.00	19.6
TMN	<16		>16	-	-	10.30	-	12.44	21.3
SXT	≤10	11-15	≥16	6	18.60	18.30	17.5	8.25	-
FF	<16	/	>16	7	17.40	15.30	11.20	8.00	30.2
AM	≤13	16-14	≥18	22.34	11.22	10.25	19.20	-	12.5
AML	≤13	17-14	≥18	19.40	12.30	26.50	9.50	6.00	19.5
TI	<23		>23	0	-	-	10.5	-	-
CAZ	≤21	25-22	≥26	27.20	0	-	0	-	6
K	≤15	16	≥26	-	12.40	28.50	12.30	13.45	0
COL	<15		>15	10.25	0	-	-	-	-
RA	≤21	25-24	≥26	27.10	0	26.50	-	0	23.8
RP	≤21	20-21	≥26	18.50	15.30	-	0	0	22.5

AML : Amoxicilline, TI : Ticarcylone, CAZ : Ceftazidime, AK : Amikacine, CN : Gentamycine, K : Kanamycine, TMN : Tobramycine, RP : Pristinamycine, COL : Colistine, AM : Ampicilline, RA : Rifampicine, FF : Fosfomycine, SXT: Sulfaméthoxazole-Triméthoprime

A travers les résultats des tests d'antibiogramme effectués par l'emploi d'un certain nombre d'antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées, on constate une large variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 0 à 30.20mm.

Les antibiotiques ayant donné les plus grandes zones d'inhibition sont représentées par la Fosfomycine contre *Staphylococcus aureus* (30.20mm), la Kanamycine contre *Bacillus subtilis* (28.50mm), la Ceftazidime et Rifampicine contre *Pseudomonas aeruginosa* (27.20 et 27.10mm respectivement).

En revanche, certains antibiotiques se sont montrés inactifs contre certaines espèces bactériennes. Et autres bactéries se sont montrées résistantes contre certains antibiotique, c'est le cas d'*Ecoli* qui a montré une résistance à l'Amikacine, la Gentamycine, la Tobramycine, le Sulfaméthoxazole Trimethoprime, la Fosfomycine, l'Amoxicilline et la Kanamycine. Alors que l'espèce *Salmonella enterica* exprimé une nette résistance à l'Amikacine, l'Amoxicilline et la Ticarcyline, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* est montré résistant au Sulfaméthoxazole - Trimethoprime et à la Colistine. Par ailleurs, d'autres résistances ont été observées à l'Ampicilline et la Ceftazidime par les espèces *Staphylococcus aureus* et à l'Ampicilline par *Bacillus subtilis*. Enfin, *Bacillus cereus* montré une résistance vis-à-vis l'Amoxicilline, l'Ampicilline, la Kanamycine et la Pristinamycine.

Cette résistance est aussi marquée pour *Staphylococcus aureus* contre Ceftazidime et *Salmonella enterica* contre Ticarcyline.

VI.2.2. l'aromatogramme

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles étant bien connues, plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante action antiseptique qui agit sur les bactéries, les champignons pathogènes ainsi que les virus (Belletti et al., 2008 ; Safaei-Ghomi et Ahd., 2010).

L'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. a été évaluée qualitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et quantitativement par la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

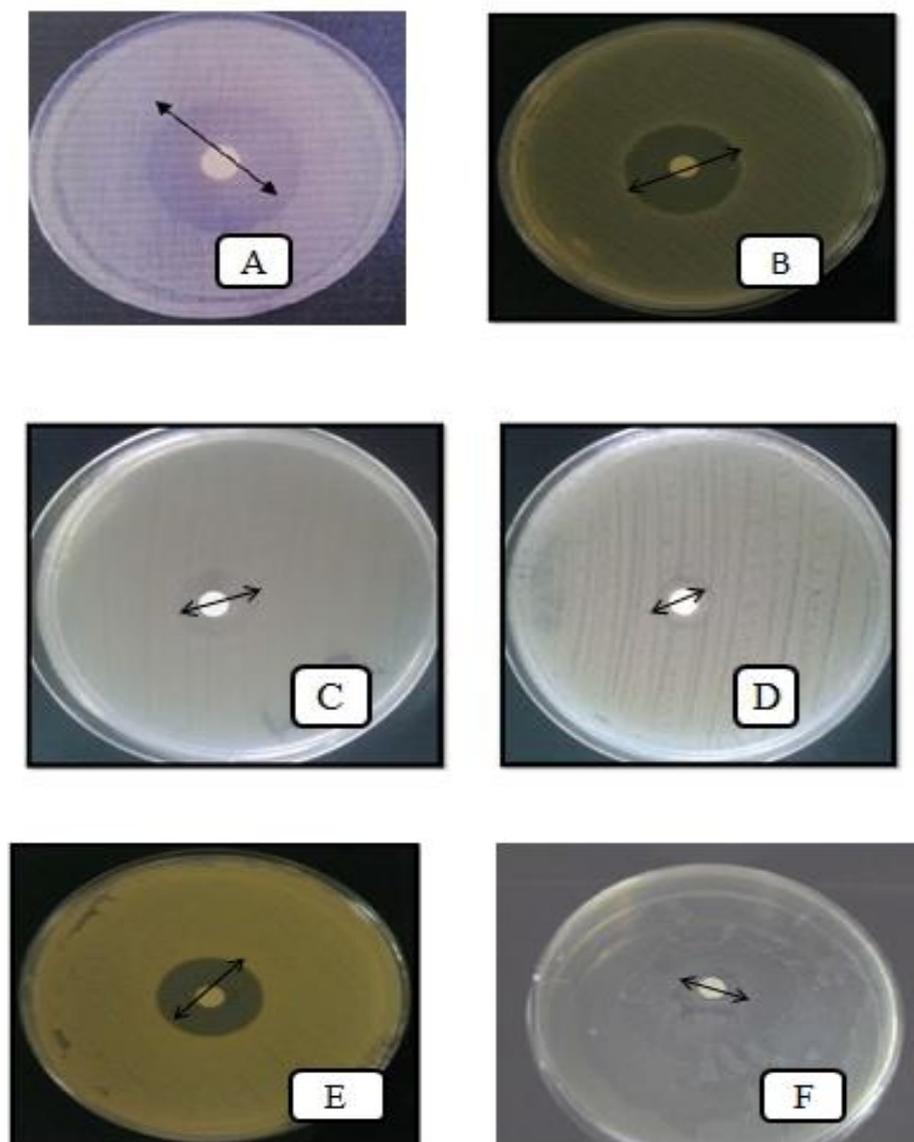
L'analyse des résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Tab.VI.4 et Fig. VI.4), révèle que les bactéries testées ont montré une certaine sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient de 9.00 à 24.70mm. Néanmoins, les espèces *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont montrées les plus sensibles comparativement aux autres espèces soient des

diamètres moyens de l'ordre de 24.70 et 23.60 mm, respectivement, suivies à un degré moins de sensibilité par les espèces *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* et *E Coli* avec des diamètres d'inhibition respectifs de l'ordre de 16.07, 14.74 ,12.60 et 9.00mm.

Tableau VI.4: Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. vis-à-vis les bactéries testées.

Souches bactériennes	Diamètre (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	24.70	ExS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23.60	ExS
<i>Bacillus subtilis</i>	16.07	TS
<i>Salmonella enterica</i>	14.74	TS
<i>Bacillus cereus</i>	12.60	S
<i>E.Coli</i>	09.00	S

ExS : Extra sensible ; TS : Très sensible ; S : Sensible



- A : *Staphylococcus aureus*
B : *Pseudomonas aeruginosa*
C : *Salmonella enterica*
D : *Bacillus cereus*
E : *Bacillus subtilis*
F : *E coli*

Figure VI.4: Aromatogramme des bactéries testées par l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L.

Dans des études antérieures, les résultats concernant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. salviifolius* ont montré que les staphylocoques étaient les plus sensibles, tandis que les bactéries Gram négatives étaient moins inhibées (**Demetzos et al., 2002**).

D'autre part, l'activité antimicrobienne des HEs de *C. salviifolius* L. contre *S. aureus* ATCC 25923, MDR *E. coli* FSST07 et *A. baumannii* ATCC 19606 pourrait être liée à la présence de diterpènes de type labdanien dans l'HE (8,1%) consistant en 13-épi-manool, l'oxyde de manoyle et l'oxyde de 13-épi-manoyle. (**Politeo., 2018**).

En comparant ces résultats avec d'autres espèces du même genre étudiées en Algérie, il a été rapporté que les huiles essentielles de ciste présentaient un degré variable d'activité antimicrobienne, l'huile de *C. monspeliensis* a montré une importante efficacité antimicrobienne en comparaison avec l'activité des autres huiles (**Bechlaghem et al., 2019**). Globalement, les bactéries à Gram positif se sont révélées plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram-négatif.

Les études sur l'activité biologique des huiles essentielles de *C. salviifolius* L. sont peu abondantes, cependant des études réalisées sur des extraits de cette plante ont démontré leur richesse en mono et sesquiterpènes, signalés comme de puissants agents anti-microbiens (**Tomas-Menor et al., 2013 ; Aránzazu et al., 2015 ; Mahmoudi et al., 2016**).

Par ailleurs, ils possèdent également une activité antifongique, (**Rebaya et al., 2016**) ainsi que des effets antioxydants élevés contre les radicaux DPPH et ABTS et un fort pouvoir réducteur ferrique par rapport aux antioxydants synthétiques (**El Euch et al., 2015 ; Sayah et al., 2017**).

Ce qui explique leur utilisation comme sources naturelles de composés antimicrobiens pour la production industrielle de produits cosméceutiques, ainsi que d'autres applications. Cela est dû essentiellement à la présence de polyphénols des, composés tels que les diterpènes de type labdan et les ellagitannines pouvant être considérés comme des agents thérapeutiques.

VI.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Après le temps d'incubation, une observation à l'œil nue a été effectuée pour l'évaluation des résultats antibactériens contre six taches bactériennes et la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Kouadio et al., 2017**).

L'effet significatif de *Cistus salviifolius* L. sur certaines souches étudiées, est illustré dans le **tableau VI.5**.

Les valeurs de CMI montrent que l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. a révélé une forte activité inhibitrice contre tous les microorganismes testés. Bien que les germes étudiés n'expriment pas la même sensibilité.

D'après les résultats obtenus dans le **tableau VI.5**, on constate que *Staphylococcus aureus* a été inhibée avec la plus faible concentration de 1/4000 (v/v) suivie par *Salmonella enterica* avec une concentration de 1/3000 (v/v). Cependant, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *E. coli* ont été inhibées avec la plus grande concentration de 1/250 (v/v).

Par ailleurs, une concentration moyenne de 1/2000 (v/v) a été obtenue avec *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau VI.5: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. vis-à-vis les six bactéries testées.

Bactéries	Concentrations de l'huile essentielle (v/v)								T
	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+

- : Absence de croissance ; + : Présence de croissance.

A l'exception d' *E coli* (Gram-) qui s'est montrée plus ou moins résistante, on peut globalement déduire que les huiles essentielles de *C. salviifolius* L. exercent un effet plus marqué sur les souches Gram-négatives que sur les souches Gram-positives.

Ces résultats sont partiellement en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande résistance par rapport aux bactéries à Gram négatif

(Russel., 1991 ; Burt., 2004 ; De Souza et al., 2005 ; Holley et Patel., 2005 ; Bakkali et al., 2008).

Plusieurs chercheurs ont en effet affirmé que l'huile essentielle testée avait une relation entre les composés volatils les plus abondants et l'activité antimicrobienne (**Koutsoukadi et al., 2005 ; Ghalem et Mohamed., 2009**).

Dans cette étude, le camphre est le principal composé d'huile essentielle de *Cistus salviifolius* L. (13.2%). En effet l'activité antimicrobienne des HEs a été signalée comme étant liée spécifiquement à la présence de composés antimicrobiens. Récemment, des essais ont été faits pour classer les composés responsables de la bioactivité.

En général, les molécules oxygénées retrouvées dans la composition des huiles essentielles sont plus actives que les molécules d'hydrocarbures, qui sont connues pour leurs faibles propriétés antimicrobiennes, d'autre part (**Kalemba et kunicka., 2003**).

Les résultats concernant l'activité antimicrobienne des trois principaux chémotypes de *C. salviifolius* L. réalisés par **Demetzos et al., (2002)** ont montré que les staphylocoques étaient les plus sensibles, tandis que les bactéries Gram négatif étaient moins inhibées.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *C. salviifolius* L. a montré une activité légèrement meilleure (diminution de 2 fois la CMI) contre *S. aureus* et *E. coli*, cela semble être lié à la présence de diterpènes de type labdane dans l'HE (8,1%) (**Politeo et al., 2018**).

Cependant le profil antimicrobien des *Cistus* est assuré par l'abondance des mono et sesquiterpènes qui ont été décrites dans les résultats d'étude réalisée par **Aránzazu et al., (2015)** comme de puissants agents anti-microbiens, ce qui favorise leur utilisation potentielle comme sources naturelles de composés antimicrobiens pour la production industrielle de produits cosméceutiques.

Conclusion générale

Conclusion

Depuis longtemps, les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées comme remèdes des maladies humaines en raison de leur teneur en composants chimiques de valeur thérapeutique. Selon l’OMS, plus de 80% de la population mondiale dépendent encore de la médecine traditionnelle pour prendre soin de leur santé.

De nombreuses plantes sont définies pour leurs vertus médicinales en Algérie, grâce à sa situation géographique, qui leur offre une végétation riche et diverse.

Le climat aussi, est un facteur très important dans la répartition et cette végétation. Celui de la région de Theniet El Had est de type méditerranéen tempéré, où se localise le Parc national (wilaya de Tissemsilt) qui se caractérise par une flore dotée d’une biodiversité considérable, elle possède de nombreuses plantes médicinales et aromatiques riches en métabolites secondaires, avec des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques.

Dans le but de la valorisation de ces ressources phytogénétiques, nous avons effectué un travail contribuant à la mise en évidence de l’activité antimicrobienne des huiles essentielles d’une espèce végétale de la famille des cistacées à savoir *Cistus salviifolius* L, après avoir identifié leur composition chimique, ainsi que l’étude de l’influence de la période de séchage de la plante fraîche avant sa mise en distillation sur la rentabilité en huile essentielle.

L’extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de la partie aérienne (feuilles) de *C. salviifolius* L. a donné un rendement très faible de l’ordre de $0.07 \pm 0,02\%$.

C’est ainsi que pour une exploitation industrielle, il convient donc d’extraire l’huile essentielle des feuilles de *C. salviifolius* L. environ trois jours après leur récolte, puisque la teneur en huiles essentielles serait à son maximum.

L’analyse de ces huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) a permis d’identifier 39 composés, dont les plus importants sont représentés par des groupements chimiques appartenant aux sesquiterpènes oxygénés (30.76%), les monoterpènes oxygénés (17.94%), les sesquiterpènes hydrocarbonés, les esters, les diterpènes ainsi que d’autres composés qui enregistrent un pourcentage appréciable équivalent de 12.82%.

En comparant les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles avec des résultats antérieurs, on a constaté beaucoup de similitudes, mais également des controverses liées à l'absence de certains groupements chimiques.

La variabilité de la composition chimique observée d'un point de vue qualitatif et quantitatif dans les huiles essentielles est vraisemblablement liée à un ensemble de facteurs à la fois extrinsèques et intrinsèques.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré un effet inhibiteur contre les six souches de référence testées, par la méthode d'aromatogramme, La plus sensible est *Staphylococcus aureus* 25923 avec une zone d'inhibition de 24.70mm.

Concernant les valeurs des CMI (concentrations minimales inhibitrices), Il s'est démontré que *Staphylococcus aureus* a été inhibée avec la plus faible concentration de 1/4000 (v/v) suivie par *Salmonella enterica* avec une concentration de 1/3000 (v/v). Cependant, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *E. coli* ont été inhibées avec la plus grande concentration de 1/250 (v/v).

Par ailleurs, une concentration moyenne de 1/2000 (v/v) a été obtenue avec *Pseudomonas aeruginosa*.

L'activité antimicrobienne exercée par les huiles de *C salviifolius* L semble être liée au camphre, trans-ferruginol, éthyle-hexadecanoate, caryophyllène oxide.

Par comparaison aux huiles essentielles de *C salviifolius* L, les antibiotiques n'étaient pas tous actifs contre les souches testées, certains étaient même inactifs, le cas de Ticarcycline, l'Amikacine, le Ceftazidime. Le plus grand diamètre d'inhibition a été enregistré chez la Fosfomycine (30.20mm) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cette étude reste évidemment préliminaire; elle pourrait constituer une contribution pour d'autres études. Pour cela, nous recommandons en perspectives:

- Étude comparative de la composition chimique et de l'effet antimicrobien des huiles essentielles à différentes périodes du cycle végétatif et d'espèces provenant de différentes régions;
- Identifier les molécules responsables des activités biologiques afin d'élucider leur mécanisme d'action en vue de supplanter les substances synthétiques utilisées en thérapeutique ou en industrie;
- Étude des activités antibactériennes de l'association huile / antibiotique pour d'autres antibiotiques par d'autres méthodes;

- Étude des autres activités biologiques de cette plante telles que l'activité anti oxydante, antivirale, antifongique, anti-inflammatoire, afin de montrer leurs importance et la possibilité de leurs exploitation dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, insecticide et alimentaire;
- Évaluer la cytotoxicité des huiles essentielles de cette plante sur des modèles animaux;
- Etude des mécanismes d'action et les facteurs influençant l'efficacité des huiles essentielles;
- L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des vapeurs de ces huiles sur plusieurs souches microbiennes en vue d'une éventuelle désinfection de l'air contaminée des hôpitaux ou des canaux d'aération des bâtiments.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Adams R., 2007.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-mass Spectroscopy, Allured Publishing Corp, Carol Stream, Illinois, USA.
- Afnor (Association Française de Normalisation), 1986.** Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. *AFNOR, Paris, 57p.*
- Afolajan AJ, Asekun OT., 2008.** Comparative study of the chemical profile of the essential oils of ripe and rotten fruits of Citrus aurantifolia Swingle. *Natural Product Communications*, 3, 1133–1136.
- Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé), 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for Pseudomonas-Aeruginosa. *Appl Microbiol* 28: 987-991.
- Alaoui A. et Laaribyia S., 2017.** Etude ethnobotanique et floristique dans les communes rurales Sehoul et Sidi Abderrazak (cas de la Maamora-Maroc Septentrional) Algérienne, *Nature & Technology Journal*. Vol. B : Agronomic & Biological Sciences, 17. 15-24:
- Al-Jabera H, Mahmoud A. Al-Qudahb, Lina M. Barhoumic., Is-mail F., Abazad and Fatma U. Afifid., 2012.** Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried *Salvia palaestina* Benth. (Lamiaceae) growing wild in Jordan. *Natural Product Research*. Vol. 26, No. 13 : 1179–1187.
- Al-Khalil S., 1995.** A survey of plants used in jordanian traditional medicine. *Int. J.Pharmacogn.* 33, 317–323.
- Alleman F, Gabriel I, Dufourcq V, Perrin F, Gabarrou1 J., 2013.** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 1. Performances de croissance et réglementation. *INRA Prod. Anim.*, 2013, 26 (1), 3-12.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, et al., 2010.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–9.
- Allen K G, Banthorpe D V and Charlwood B V., 1977.** Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. *Phytochemistry*. 16, 79-83.
- Alsheikh AM., 1994.** Taxonomy and mycorrhizal ecology of the desert truffles in the genus *Terfezia*. Ph.D dissertation. Oregon State University, Corvallis.
- Amagase H., 2006.** Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 136, 716S–725S.

- Ammari H, Benslimani A, Rahal K, Tali-Maamar H, Kechih-Boumar S. 2011.** Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (medecine humaine et veterinaire), 6^e édition, OMS, 195.
- Amrani A E., 1999.** Effets de la période de récolte, du niveau de coupe et de la région sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle, Doctorat en chimie organique, Université Hassan II ; Faculté des sciences Ben M'sik ; Casablanca Maroc.
- André C et Bettenfeld M L., 2012.** Applications des huiles essentielles dans le domaine des arômes et parfums. In. X. Fernandez & F. Chemat (Eds). La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation. (pp. 193-211). Paris: Vuibert.
- Andrews R E, Parks L W, Spence K D., 1980.** Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 301–304.
- Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc, Paris.*
- Aprotosoiaie A C, Spac A D, Hancianu M , Miron A , Tanasescu V F , Dorneanu V, Stanescu U., 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58(1), 46-54p.
- Aránzazu M, JoseOruna-Concha M., StephenElmore J, Enrique B, Vicente M , Cristina R , AntonioSeguraC., 2015.** Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. **Industrial Crops and Products Volume 74** :425-433
- Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, A Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris.
- Arrington JM, Kubitzki K., 2003.** Cistaceae. In : Kubitzki K, Bayer C (eds) The families and genera of vascular plants. Malvales, Capparales and non-betalain Caryophyllales, *Springer Berlin.*, 5, p 68.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4>.
- Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ., 2007.** Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chem.*, 101: 995-998.
- Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S., 2004.** *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*; 92: 245-250.

- Audigie C L, Dupon G et Zonsgain F., 1995.** Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44.
- Avorn JL, Barrett JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brien TF, Levy SB., 2001.** Organisation mondiale de la sante (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics.
- Avril JL, Dabemat H Denis F, Monteil H., 1992.** «Bactériologie Clinique» 2ème Ed. Ellipses, Paris, p512.
- Avril JL, Fauchère JL., 2002.** «Bactériologie générale et médicale» Ed. Ellipses, Paris.p
- Aït Youssef M., 2006.** Plantes médicinales de Kabylie. Ed. Ibis Press, Paris, 349p.
- Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. 2011.** Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical Chemistry Reference Data*, 40(4), p1-47.
- Baillon, H., 1872.** Histoire des plantes, Monographie des Bixacées : Cistacées et Violacées. *Librairie Hachette, Paris.*, p 356.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M., 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Baraa A., 2009.** Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: a review of Recent Developments. *Natural Product Communications* Vol. 4 (8).
- Bardeau F., 1976.** La médecine par les fleurs. Laffont éd. p100-120
- Barrajón-catalán E, Fernández-arroyo S, Saura D, Guillén E, Fernándezgutiérrez A, Segura-carretero A, Micol V., 2010.** Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48, p. 2273–2282.
- Barrajón-Catalán E, Tomás-Menor L, Morales-Soto A , MartíBruñá N . Domingo SauraLópez D . Segura-Carretero A . Micol V., 2016.** Chapter 74 - Rockroses (*Cistus* sp.) Oils. Pages 649-658.
- Barry N., 2001.** Art d'extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi même. *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 125-128p.
- Başer K H C. and Buchbauer G., 2010.** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

- Baser, K.H.C. and G. Buchbauer., 2015.** *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*: CRC Press.
- Başlar S, Doğan Y, Mert HH., 2002.** A Study on the Soil-Plant Interactions of Some *Cistus* L. Species Distributed in West Anatolia. *Turk J Bot* 26. 149-159
- Bassereau M, Chaintreau A, Druperrex S, Joulain D, Leïjs H, Loesing G, Owen N, Sherlock A, Schippa C, Thorel P J , Vey M., 2007.** GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. Data treatment strategies and method performances . *J Agric Food Chem*, 55, 25-31.
- Baudoux D., 2008.** L' aromathérapie, se soigner par les plantes. Bruxelles : Ed. Amyris, 256p. ISBN 978-2930353616
- Bayer E, Buttler K P, Finkenzeller X, Grau J., 1990.** Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 287p.
- Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A., 2010.** Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*. v. 9, p. 4251–4258.
- Baytop T., 1999.** Therapy with medicinal plants in Turkey: Past and Present. Nobel Tıp Kitabevi, Istanbul.
- Beaucaire G., 1997.** Infections nosocomiales. Epidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe de traitement. *Rev Prat.*, 47, 201 – 209.
- Bechlaghem K, Allali H, Benmehdi H, Aissaoui N, Flamini G., 2019.** Chemical Analysis of the Essential Oils of Three *Cistus* Species Growing in North- West of Algeria. *Agric. conspec. sci.* Vol. 84 No. 3 (283-293).
- Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C., 2004.** Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4988-4995.
- Bedoya L M, Bermejo P, Abad M J., 2009.** Anti-Infectious Activity in the Cistaceae Family in the Iberian Peninsula. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.*, 9, pp 519-525.

- Belabed S., 2018.** 4.000 à 5.000 cas de toxi-infections alimentaires collectives chaque année. Revue algérienne,
[https://www.sudhorizons.dz/fr/les-classiques/sante/34840-4-000-et-5-000-cas-de-toxi-infections-alimentaires-collectives-chaque-annee.](https://www.sudhorizons.dz/fr/les-classiques/sante/34840-4-000-et-5-000-cas-de-toxi-infections-alimentaires-collectives-chaque-annee)
- Belaiche P., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Belaiche, P., 1979.**Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine.
- Belletti N , Lanciotti R , Patrignani F , Gardini F., 2008.** Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. J Food Sci; 73: 331-8.
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P., 2006.** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43,149–154.
- Ben Jemia M, Kchouk M E, Senatore F, Autore G, Marzocco S, De Feo V, Bruno M., 2013.** Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistuslibanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chem. Cent. J.* 7, 47–53.
- Benchaar C., Greathead H., 2011.** Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 166–167 (2011) 338– 355
- Benchaar C., McAllister TA., Chouinard, P.Y., 2008 a.** Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.* 91, 4765–4777.
- Bencheikh S, Goudjil M, Zighmi S et Ladjel S., 2015.** Effet du séchage sur le rendement des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp. *aurasianum* Labiatae. *annale des sciences et des technologies.*ISSN 2170-0672. Vol17.
- Benchikh S., 2017.** Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum* Labiatae, *Thèse de doctorat* 40.
- Beniston N T., Beniston WS., 1984.** Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise nationale du livre, Alger, 359p.

- Berche P, Gallard J L, Simonnet M., 1991.** les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion, p, 64-71.
- Bernadet M., 2000.** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Dictionnaire thérapeutique de 530 affections courantes. *Dangles, Toulouse, France*, p384
- Berthier A., 1980.** Epices-aromates leurs huiles essentielles et oléorésines. parfums, cosmétiques, arômes n°34- août/septembre 1980 ; p 39-44.
- Berthonnet A., 2010.** Parcs nationaux et tourisme en Algérie dans les années 1920, une expérience coloniale effacée par l'histoire. "*Pour mémoire*", la revue du Comité d'histoire, 9:164–169.
- Besombes C, Berka-Zougali B, & Allaf K., 2010.** Instant controlled pressure drop extraction of lavandin essential oils: Fundamentals and experimental studies. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6807–6815.
- Bocchio E., 1985.** Hydrodistillation des huiles essentielles : Théorie et applications. Parfums, cosmétiques, aromes. 61-2.
- Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, et al., 1999.** Characteristics of polyclonal endemicity of *P. aeruginosa* aeruginosa colonization in intensive care units: implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med*; 160: 1212-9.
- Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A and Jana M., 2006.** Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species, *J. Ethnopharmacol.* 104, 104-107.
- Bouchonnet S, Libong D, 2002.** Le couplage chromatographique en phase gazeuse spectrométrie de masse. Département de chimie, Laboratoire des mécanismes réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.
- Bouhi S, Talbi M, Belarabi S, Soulaymani R, Mokhtari A, Soulaymani A., 2007.** L'étude des toxi-infections alimentaires au Maroc. Le premier congrès national sur l'amélioration de production agricole.
- Bousbia N., 2011.** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Ex-INA El Harrach, Alger, p3/175.
- Bouvet P J M, Crimont P A D., 1989.** Acinetobacter In : Le MINOR L et VERON M, eds. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, p 599-604.

- Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Charfi S, Abrini J, Dakka N., 2017.** Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytothérapie* DOI 10.1007/s10298-017-1118-z
- Bouzerگونه F., 2010.** Etude photochimique de la plante *Helianthemum Kahiricum*. Thèse de magister. Univ HADJ LAHKDAR-BATNA.
- Bowles E J., 2003.** The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Allen & Unwin, Australia. 257p.
- Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C., Padurariu C., 2009.** Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 36-39p.
- Bregante M A., Capó M., Morales R M., and Ballesteros E., 1981.** Convulsive syndrome in mice produced by extracts of *Cistus laurifolius*. *Gen.Pharmacol. Vasc.Syst.* 12, A30.doi:10.1016/0306-3623(81) 90165-8.
- Brian M L.,1995.** *The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds*
- Brizicky G K., 1964.** The genera of Cistaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum.*, 45, p 346-357.
- Bruneton J., 1993.** *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales.*
- Bruneton J, 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc.Lavoisier, Paris, p1120.
- Bruneton J., 2008.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1188.
- Bruneton J., 2009,** Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales. 4e éd. Paris : Tec & Doc, 1269 pages
- Buisson Y and Teyssou R., 2002.** Les toxi-infections alimentaires collectives. *Revue française des laboratoires.* 348, 61-66.
- Burt S., 2004.** Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Caissard J C et Baudino S., 2012.** Sécrétion et stockage des huiles essentielles par les végétaux. In. X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et Innovation* (pp. 22-34). Paris: Vuibert.

- Callaway T R, T S Edrington, R C Anderson, J A Byrd and D J Nisbet., 2008.** Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella. *Journal of Animal Science*. Volume 86 P. 163-172.
- Carette A S., 2000.** La lavande et son huile essentielle. *Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, p100.*
- Cavalli J F., 2002.** Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. *Thèse de doctorat en chimie organique et analytique, Université de Corse, France, p274.*
- CFDCP: Centers for Disease Control and Prevention., 2011.** Salmonella. Web. 16 Mar 2011. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases.
- Chaintreau A, Joulain D, Marin C, Schmidt CO, Vey M., 2003.** Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *J Agric. Food. Chem.* 51 : 398-403.
- Chami F., 2005.** Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, p266.
- Charabot E. ; Dupont J. et Pillet L., 1899.** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants, Ed. CH. Beranger, Paris.
- Chaudhary AS., 2016.** A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics ' discovery. *Acta Pharm Sin B* 6:552–6.
- Chavanne P., 2011.** 200 remèdes au citron. Editions First – Grund, Paris, p255.
- Chemat F, Fabiano-Tixier A S et Abert Vian M., 2012.** Éco-extraction des huiles essentielles: Intensification et innovation. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation.* (pp.102-123). Paris: Vuibert.
- Chenni M., 2016.** Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic *Oimum basilicum L.* extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. Thèse de doctorat. Université d'Oran. P63.64.
- Chorianopoulos N G, Giaouris E D, Skandamis P N, Haroutounian S A, Nychas GJE., 2008.** Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed

- of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J. Appl.*
- Chouitah O., 2012.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat.17
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck A.J., 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
- Clarke S., 2008.** Chemistry of essential oil. 1st edition Elsevier. British, 302p.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2002.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. *Wayne (Approved Standard M38-A)*.
- Collin G., 2000.** Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*;13: 4-5.
- Comandini O, Contu M, Rinaldi A C., 2006.** An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* ;16:381-395. composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. *Journal of Applied Sciences*, 7(23),3806-3810.
- Conly J, Hills M, Poss J., 2009.** Hand washing practices in ICU: the effects of an educational program and its relationship, to infection routes. *AM. J. Infect. Control*, 17, 330-339.
- Conner D E., 1993.** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. ; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- Coode M J E., 1988.** *Cistus*, In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, eds: Peter Hadland Davis, Robert Mill, Kit Tan, Edinburgh University Press: Edinburgh. p. 61.
- Corzo-Martinez M., Corzo, N., Villamiel, M., 2007.** Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol.* 18, p609–625.
- Cosimi S, Rossi E, Cioni P L, Canale A., 2009.** Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes*

- ferrugineus (Stephens) and Tenebriomolitor (L.), *Journal of Stored Products Research*, 45 (2009)125–132.
- Coste H, Flahault CH., 1937.** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes, I. Ed. Librairie des Sciences et des Arts, Paris, 52p.
- Couic-Marinier F., Lobstein A., 2013.** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* ; 52 (525) : 18-25.
- Cristiani M, D'arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro M G, Micieli D., 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300-6308p *Microbiol. 104*, 1586–1599.
- Croteau R, Kutshan TM, Lewis NG., 2000.** Natural products (secondary metabolites). In: Buchana, B., Grisse, W., Jones, R. (eds), *biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of plant Physiologists, 1408 : 1250-1268.
- Da Porto C, Decorti D, et Kikic, I., 2009.** Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072–1078.
- Damerdji a., 2012.** La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale) Département d'Écologie et Environnement, Faculté S.N.V/S.T.U, Université de Tlemcen, Algérie.
- Damian P, Damian K.** 1995. *Aromatherapy : Scent and Psyche ; Using Essential Oils for Physical and Emotional Well-Being*, edition Healing Arts Press, 264.
- Daniel M., 2006.** *Medicinal Plants: chemistry and properties*; Ed: SCIENCE PUBLISHERS.P 59,77.
- Davidson P M., 2001.** Chemical Preservatives and Naturally Antimicrobial Compounds. In *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed.; Beuchat, M.P., Montville, L.R., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA; pp. 593–628.
- De bonneval Patrice, Dubus F., 2014.** *Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien*. Desiris.
- De Feo V, Bruno M, Tahiri B, Napolitano F, Senatore F., 2003.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Thymus spinulosus* Ten (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3849-3853.

- De Maack F et Sablier M., 1994.** Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. Référence: P2614.
- 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.
- De Silva T., 1995.** Development of essential oil industries in developing countries. Austria: K.Tuley de Silva.
- De Souza E L , Stamford T L M , Lima E O , Trajano V N and Filho J M B., 2005.** Antimicrobial effectiveness of spices : an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(4): 559-566.
- Degryse A.C., Delpla I and Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement-IGS-EHESP*, p87.
- Demetzos C, Magiatis P, Typas M A, Dimas K, Sotiriadou R, Perez S and Kokkinopoulos D., 1997.** Biotransformation of the flavonoid tiliroside to 7-methylether tiliroside: bioactivity of this metabolite and of its acetylated derivative. *CMLS 53*. Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel:Switzerland
- Demetzos C, Mitaku S, Couladis M, Harvala C and Kokkinopoulos D., 1994.** Natural metabolites ofent-13-epi-Manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin "LADANO" of *Cistus creticus*, *Planta Med.* 60, 590-591.
- Demetzos C, Dimas K, Hatziantoniou S, Anastasaki T, Angelopoulou D., 2001.** Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane typediterpenes. *Planta Medica.* v. 67, p. 614–618, 2001.
<http://dx.doi.org/10.1055/s--17362>.
- Demetzos C, Dimitra A, Dimitrios P., 2002.** A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology* 30 : 651–665.
- Demetzos C, Stahl B, Anastassaki T, Gazouli M, Tzouvelekis LS, Rallis M., 1999.** Chemical analysis and antimicrobial activity of the resins Ladano, of itsessential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica.* v. 65, p. 76–78
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-960444>.
- Demoly JP et Montserrat P., 1993.** Cistus. In: Castroviejo S, Aedo C, Cirujano S, Laínz M, Montserrat P, Morales R, Muñoz Garmendia F, Navarro C, Paiva J, Soriano C, eds. *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, Vol.

- III. Madrid, Spain: Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC, 319–337.
- Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R., 2011.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 2nd Edition Elsevier Masson, p640.
- Descenlos JC., 2009.** RAISIN - A national programme for early warning, investigation and surveillance of healthcare-associated infection in France. *Euro Surveill*;14:19408.
- Desjobert J M, Bianchini A, Tommy P, Costa J et Bernardini A F., 1997.** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis* ; 25 (6) :13-16.
- Dethier M., 1996.** Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi. *Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, p182.*
- Devine K., 2004.** « *Bacillus subtilis* genetics », In *Schaechter M* (Ed), Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, San Diego, CA, USA, p126-134.
- Dewick PM., 2002.** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, second edition. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.
- Dimas K, Demetzos C, Angelopoulou D, Kolokouris A, Mavromoustakos T., 2000.** Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmacological Research*. v. 42, p. 475–478, 2000. <http://dx.doi.org/10.1006/phrs.0716>.
- Dolatowski ZJ, Stadnik J, Stasiak D., 2007.** Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment*. 6 (3), 88-99.
- Downard K., 2004.** Mass spectrometry : a foundation course. Royal Society of Chemistry.
- Doyle MP., 2006.** Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 5:71–137.
- Drobniewski F A., 1993.** *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev*. 6:324–338.
- Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S and Planz O., 2007.** CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice, *Antivir Res*. 76, 1-10.
- Duarte M C T, Figueira G M, Sartoratto, Rehder VLG, Delarmelina C., 2005.** Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
- Duduku K, Rosalam S and Rajesh N., 2011.** A Review of the Antioxidant Potential of Medicinal Plant Species. *Food and Bioprocesses Processing*, 89 : 217-233.

- Duke J, Duke P A, and duCellier J., 2008.** *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Duraffourd C, L D'Hervicourt, and J C Lapraz., 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques, 2ème éd. Masson, Paris. .
- Duru M., 2003.** Effect of nitrogen fertiliser rates and defoliation regimes on the vertical structure and composition (crude protein content and digestibility) of a grass sward. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 : 1469–1479.
- Durville J- P., 1930.** Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, p807.
- Duval J., Soussy C J., 1993..** Antibiothérapie, 4ème édition. *Ed Masson*, Paris.
- Echchaoui M., 2018.** Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Univ Rebat.
- Edeoga H O, Okwu D and Mbaebie1 B., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal Plants *African Journal of Bio-technology* Vol. 4 (7) : 685-688
- Edris A E., 2007.** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res*, **21**, p308-323.
- Edwardien, M., A. Belanger, and B. Benjilal., 1993.** Les huiles essentielles de la verveine odorante (*Lipia citriodora* L.) du Maroc : effet de séchage sur le rendement en HE et sa composition chimique. Communication aux 12èmes journées mondiales HE. Dignes-Les
- Ehrhardt C, Hrinčius E R, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, Dreschers S, Schmolke M, Planz O and Ludwig S., 2007.** A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance, *Antivir Res.* 76, 38-47.
- Eisenhut M., 2007.** The toxicity of essential oils., article in presse, *International Journal of Infectious Diseases*. 11(4): 365.
- El Abdouni Khiyari M, Kasrati A, Jamali CA, Zeroual S, Markouk M, Bekkouche K, Abbad A., 2014..** Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* (Webb. & Helder), an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Industrial Crops and Products*, 57, p106–109.

- El Euch Sk, Bouajilac J, Bouzouitaa N., 2015.** Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products* 76 : 1100–1105. Moroccan Journal of Chemistry. ISSN :2351-812x
- El Kolli M., 2008.** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemis pedunculata* Desp., d'*Athemis punctata* Vahl. et de *Daucus crinitus* Desf. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- El Ouali Lalami A, EL-Akhal F, Ouedrhiri W, Ouazzani Chahdi F, Guemmouh R, Greche H., 2013.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, 8 N°31. 27-33.
- El yousfi K, Greche H, Misbahi H, Ben cheikh R., 2020.** Phytochemical evaluation and vasodilatory activity of *O. elongatum*, *C. salviifolius* and *C. laurifolius*.
- El Zakhem M., 2003.** Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l'*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida : albicans, holmii*, et *famata*. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).
- Elamrani A, et al., 1997.** Effet du séchage sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de romarin du Maroc (*Rosmarinus officinalis* L.). In Actes du colloque « Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles ».
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, Romdhane M., 2009.** Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Science*, 74(7), p364-371.
- Essaqui A, S Khoudali S, Es seddiki S., 2016.** Drying Effect on Yield and Chemical Composition of Essential Oils of *Warionia saharae* from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* Volume 19- Issue 4 <https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1024442>.
- Fanourioua E, Kalivasb D, Dafererac D, Tarantilisc P, Trigasd P, Vahamidisa P, Garifalia E., 2018.** Hippocratic medicinal flora on the Greek Island of Kos: Spatial distribution, assessment of soil conditions, essential oil content and

- chemotype analysis. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.03.003>.
- Fantino N S., 1990.** Etude du polymorphisme d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. *Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France*, 41-45p.
- Farah A, Satrani B, Fechtal M, Chaouch A, Talbi M., 2001.** Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Eucalyptus camaldulensis* et son hybride naturel (clone 583). *Acta Botanica Gallica*, 148 (3), 183-190.
- Farley R et McNeilly T., 2000.** Diversity and divergence in *Cistus salvifolius* (L.) populations from contrasting habitats. *Hereditas*;132:183-192.
- Farmer J J, Boatwright K D, Janda J M. Enterobacteriaceae : Introduction and Identification. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L.; Pfaller, M. A., 2007.** Manual of Clinical Microbiology 9th ed, p 649-669.
- Fartoukh M, Ricard JD., 2009.** Pneumonies nosocomiales : aspects pratiques de la prise en charge *Rev Mal Respir*;26:463-7.
- Fasty D., 2007.** Ma bible des huiles essentielles. Leduc Editions. P20.
- Fekih N., 2014.** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *pinus* poussant en algérie thèse de doctorat p8.
- Fernández-Mazuecos M and Vargas P., 2010.** Ecological rather than geographical isolation dominates Quaternary formation of Mediterranean *Cistus* species. *Molecular Ecology*.;19:1381-1395.
- Ferrandis P, Herrantz JM, Martínez-Sánchez JJ., 1999.** Effect of fire on hardcoated *Cistaceae* seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecol*; 144: 103–114.
- Filloux A, and Vallet I., 2003.** Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. *M S-Medecine Sciences* 19: 77-83.
- Finland M., 1979.** Emergence of antibiotic resistance in hospitals 1935–1975. *Rev Infect Dis* 1:4–22.
- Flück H., 1942.** Nos plantes médicinales. Traduit par Weitzel R., librairie Payot, Lausanne, pp. 8- 14.
- Fouché J G., Marquet A, Hambuckers A., 2008.** Les plantes médicinales de la plante au médicament Conception et réalisation.

- Franchomme P, Pénoel D., 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Edition Roger Jallois, Limoges, France*, 445p.
- François S., 2000.** Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. *Hygiène en milieu*.
- From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum P E., 2005.** Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Ap p lie d and Environm e ntal Microb iology*, 71(3): 1178-1183.
- Funk & Wagnalls., 2004.** Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls.
URL: <http://www.Funkandwagnalls.com>.
- Galanis E, D M Lo Fo Wong, M E Patrick, et al., 2006.** World Health Organization Global Salm-Surv. Webbased surveillance and global Salmonella distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis*. 12: p381–388.
- Ghalem BR, Mohamed B., 2009.** Antimicrobial activity evaluation of the oleoresin oil of *Pistacia vera* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(3), 092-096.
- Gibbons S., 2008.** Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 74: p594-602
- Gill A O, Holley R A., 2006.** Disruption of *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* ellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 108, p1–9.
- Granum P E and T Lund., 1997.** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: p223–228.
- Greche H, Mrabet N, Zrira S, Ismaili-Alaoui M, Benjilali B, Boukir A., 2009.** The volatiles of the leaf oil of *Cistus ladanifer* L. var. *Albiflorus* and *Labdanum* extracts of moroccan origin and their antimicrobial activities. *J. Essent. Oil Res.* 21, p166–173.
- Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK, Vitanza-jack VB., 1974.** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol.* 1974 Dec;28(6): p987–991
- Grimont P A D., 1992.** Les marqueurs épidémiologiques des Salmonella. *Méd. Mal. Infect.*, 22, spécial, p249-257.
- Grosso C, Ferraro V, Figueiredo A C, Barroso J G, Coelho J A and Palavra A.M., 2008.** Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds, *Food chemistry.* 111 (1): p197-203.
- Grysole J., 2004.** La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. p139-141.

- Grysole J., 2005.** La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, p.139-162.
- Güemes J., 1999.** A new species of Fumana (Cistaceae) from Rif Morocco. *Folia Geobotanica.*, 34, p 363-372.
- Guignard JL., 2001.** Botanique. Systématique moléculaire. Ed. Masson (12^{ème} édition), Paris, p290.
- Guinoiseau Elodie., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat.
- Gulz p G., Herrmann T., Hangst K., 1996.** *Leaf trichomes in the genus Cistus.* Flora,191: 85-104.
- Gürbüz P, Koşar M, Güvenalp Z, Kuruüzüm Uz A, Demirezer EÖ., 2018.** Simultaneous determination of selected flavonoids from different *Cistus* species by HPLC-PDA. *Marmara Pharm J*; 22 (3): p405-410.
- Gustafson J E, Liew Y C, Chew S, Markham J L, Bell H C, Wyllie S G, Warmington J R., 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli.* *Lett. Appl. Microbiol.* 26, p194–198.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P., 2008.** The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 91–97.
- Guvenc A, Yildiz S, Ozkan A M, Erdurak C S, Coskun M, Yilmaz G, OkuyamaT and Okada Y., 2005.** Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species, *Pharm. Biol.* 43, p178-183.
- Guzmán B, Vargas P., 2009.** Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences. *Org Divers Evol* 9. p83–99.
- Guzmán B, Vargas P., 2009.** A Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography.*, 36, p954-968.
- Guzmán B, Vargas P., 2005.** Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Mol Phylogenet Evol*; 37: p644–660.

- Haddouchi F, Benmansour A., 2008.** Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire : 8, p20-27.
- Haley RW, Culver DR, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP *et al.*, 1985.** The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol* ;121: p182-205.
- Hamel T, Sadou S, Seridi R, Boukhdir S, BoulemTafes A., 2018.** Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien)., *Ethnopharmacologia*, n°59.
- Hammer K A., Carson C F., Riley T V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), p 985-990.
- Hannig C, Spitzmuller B, Al-Ahmad A and Hannig M., 2008.** Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle, *J. Dent.* 36, 540-545.
- Haouat A C., Sqalli H, Farah A, Haggoud A, Iraqui M., 2013.** Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytotherapie* 11, p365–372.
- Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG., 2009.** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, 116, 714-721. *hospitalier*.30: p8-13.
- Helander I.M, Alakomi H L, Latva K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris L G M, von Wright A., 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, p3590–3595.
- Hensel M., 2009.** "Secreted Proteins and Virulence in *Salmonella enterica*". *Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-42-4.
- Herrera J., 2004.** Lifetime fecundity and floral variation in *Tuberaria guttata* (Cistaceae), a Mediterranean annual. *Plant Ecology*., 172, p 219–225.
- Holley A., 1999.** *Eloge de l'odorat*: Odile Jacob.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/917151

- Holley R A and Patel D., 2005.** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22 (4): p273–292.
- Hudaib M, Speroni E, Di Pietra AM, Cavrini V., 2002.** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variation during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, p691–700.
- Humphrey TJ., 2000.** Public-health aspects of Salmonella infections. In: Salmonella in domestic animals. Wray, C., and A. Wray (eds), CABI publishing, CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Hurtel J., 2006.** Huiles essentielles et médecine. Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. *Phytomania*.
- Husnu can başer K, Buchbauer G., 2010.** Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application. Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS., P: 121.
- Inouye S, Abe S., 2003.** Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy*, vol 13, p 33-41.
- INPV., 2019.** Inventaire National du patrimoine Naturel.
- Ishii S, Sadowsky MJ., 2008.** Escherichia coli in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*.
- Jaleel C A, Sankar B, Murali P V, Gomathinayagam M, Lakshmanan G M A and Panneerselvam R., 2008.** Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 62: p105–111.
- Jehl F, Lina G, Bonnet R, Bru JP, Caron F, Cattoir V, Chardon H, Courvalin P, Dubreuil L Jarlier V, Lambert T, Lefort A, Merens A, Nicolas-Chanoine MH, Plesiat P, Poly MC, Soussy CJ, Varon E, Weber P., 2015.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Recommandation de 2015). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST, 117.
- Joffin J N and G L G., 1996.** Microbiologie technique : dictionnaire des techniques. Centre régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine; 131., P131.

- Johnson CB, Kirby J, Naxakis G, Pearson S., 1999.** Substantial UV-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 51, p507-510.
- Jones JDG, Dangl JL., 2006.** The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329
- Jones M G., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A B., Collin H A., 2004.** Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.* 55, 1903–1918.
- Joulain D., 1994.** Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist* ; 19: 5-17.
- Julve, Ph., 2020.** ff - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 27 avril 2020.
- Juven B J, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H., 1994.** Factors that Interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, p626–631.
- Kalemba D and Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: p813-829.
- Kaloustian J, Hadji-minaglou F., 2012.** La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer Paris.
- Kalus U, Grigorov A, Kadecki O, Jansen J P, Kiesewetter H and Radtke H., 2009.** *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study, *Antivir Res.* 84, p267-27.
- Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H., 2006.** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.*, 72, 1330-1334.
- Kelen M., Tepe B., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 99(10), p4096-4104.
- Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, Sefidkon F and Pirmoradei M.R., 2005.** Comparison of essential oil composition of *Ferula assafoetida* obtained by

- supercritical carbon dioxide extraction and hydrosistillation methods. *Food Chemistry*, 91: p639-644.
- Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F. and Bahramifar N., 2004.** Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 86: p587-591.
- Khalil H, Aboubakr A E, Alrawiq N, Yossif Ali A, Hamed R, et Ibrahim R., 2014.** Study of Antibacterial Activity of *Cistus salviifolius* L. extracts (Cistaceae) against *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwiniacarotovora*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Science and Humanities*.
- Kim S I & Lee D W., 2014.** Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(1), p13–17.
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B., 1988.** Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oils Res*, 1, p119–128.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M et Mete E., 2008.** Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), p8788–8795.
- Kouadio N, Kone M, Guessennd N K , Konan Ke, Moussa B, Yao K., Allagba-Atsain M, Tra-bi F, Bakayoko A and Dosso M., 2017.** Evaluation of the antibacterial activity of leaves *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) on the in vitro growth of producing Enterobac-teriaceae of beta-lactamases at extended spectrum (ESBL) strains and phytochemical screening. *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 : p431-440.
- Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A., 2005.** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), p7681-7685.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, & Satya S., 2011.** Insecticidal properties of Mentha species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802–817.
- Kumar P, Mishra S , Malik A , Satya S., 2012.** Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122(2), p212–218.

- Kun DN, Chappell J, Boudet A, Hahlbrock K., 1984.** Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 81, p1102-1106.
- Kusuma HS, Mahfud M., 2017.** The extraction of essential oils from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using a microwave air-hydrodistillation method as a new green technique. *The Royal Society of Chemistry*, 7(3), p1336-1347.
- Labiod R., 2016.** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse doctorat 45.
- Lagunez Rivera L., 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. *Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France*, 335p.
- Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448p.
- Lakhdar L., 2015.,** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans*: étude *in vitro*. Thèse de doctorat. Centre d'études doctorales des sciences de la vie et de la santé.p32
- Lamarti A, Badoc A, Deffieux G and Carde J P., 1994.** Biogénèse des monoterpènes Ilocalisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 :69-78.
- Lambert R J W, Skandamis P N, Coote P J, Nychas G J E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462.
- Laouer H., 2004.** Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Lardry JM., Haberkorn V., 2007.** Les Huiles Essentielles: principes d'utilisation. Kinésithérapie, la Revue Volume 7, Issue 61, January 2007, Pages 18-23
- Le Loir Y, Baron F., 2003.** Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research.* , 2, 63-76.

- Lendeckel U, Arndt M, Wolke C, Reinhold D, Kahne T and Ansorge S., 2002.** Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp *incanus*, *J. Ethnopharmacol.* 79, p221- 227.
- Lewis K, Ausubel FM., 2006.** Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24: p1504-1507.
- Liang YZ., Xieb P., Chan K., 2004.** Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B*, 812: 53-70.
- Lis-Balchin M, Deans S G., 1998.** Eaglesham, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.*,13, p98–104.
- Lis-balchin, M Lavender., 2002.** the genus *Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis, p 268.
- Logan N A, Rodrigez-Diaz M., 2006.** Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed. Hawkey, p139-158.
- Loizzo M R, Ben Jemia M, Senatore F, Bruno M, Menichini F, Tundis R., 2013.** Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 59, p586–594.
- Lopes N P, Kato M J, Aguiar Andrade H, Soares Maia J G, Yoshida M., 1997.** Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. *Phytochemistry*, 46, p689-693.
- Lopez D, Vlamakis H et Kolter R., 2009.** Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* 33 (2009) p152–163.
- Lorrain E., 2013.** 100 questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie.
- Loukkas A., 2006.** *Atlas Des Parcs Nationaux Algériens*. Parc National de Theniet-el-Had avec l'autorisation de la Direction Générale des Forêts, Tissemsilt.
- Lucchesi M E., 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat en Sciences, Université de la Réunion, France*, p146.
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja J., 2004.** Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327. *Tobacco Company, Winston-Salem(USA)*. p57-148.

- Lyczak JB, Cannon C L, and Pier G B., 2000.** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2: p1051-1060.
- M'Rabet N., 1999.** Le ciste ladanifère, "*Cistus ladaniferus*" du Maroc : Etude écologique, botanique, caryologique, chimique et chimiotaxonomique ; propriétés antimicrobiennes ; possibilités d'exploitation industrielle. Doctorat en biotechnologie végétale ; Université Mohamed V, Faculté des sciences, Rabat Maroc.
- Mahmoudi H, Aouadhi C, Kaddour R, Gruber M, Zargouni H, Zaouali W, Ben hamida N, Ben nasri M, Ouerghi Z, Hosni H., 2016.** Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus species* from Tunisia. *Biosci J.* 2016;32(1): p226-237.
- Maillard A., 2017.** Huiles Essentielles: toxicité contre indications dangers avec les cétones [Internet]. AMSOAM by Aude Maillard. [cited 2017 Dec 29]. Available from: <https://www.aude-maillard.fr/toxicite-des-huiles-essentiellespartie-4/>.
- Mairif M., 2013.** La typologie de la cédraie du Parc National de Théniet El Had, Un outil de description au service des gestionnaires forestiers. Mémoire de Magistère en sciences Forestières, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (Algérie), p144.
- Mann J., 1987.** *Secondary metabolism*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Mantle D, Anderton J G, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry E K., 1998.** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Biochem Physiol, part B. Biochem Molecul Biol.*, 121B, p385–391.
- Marc T, Gerard W, Denis L., 2001.** Classification des anti-inflammatoires in Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P 426.
- Marchadier E., 2009.** Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de Doctorat. Univ Paris XI.
- Marco M, Marco C, Ruben M and Antoine G., 2006.** Modelling the influence of change in fire regime on the local distribution of a Mediterranean pyrophytic plant species (*Cistus salviifolius*) at its northern range limit. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* (2006) 33, p1492–1502.
- Margulis L, J Z Jorgensen, S Dolan, R Kolchinsky, F A Rainey, and S C Lo., 1998.,** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: p1236–1241.

- Mariani-Kurkdjian P et Bingen É., 2012.** Shiga-toxin producing by *Escherichia coli*: pathophysiology and virulence. *Réanimation* (2012) 21: p268-279
- Marino M, Bersani C, Comi G., 2001.** Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedimetric method. *Int. J. Food Microbiol.*, 67, p187–195.
- Mastino PM, Marchetti M, Costa J & Usai M., 2017.** Comparison of essential oils from *Cistus* species growing in Sardinia, *Natural Product Research*, 31:3, p299-307
- McConkey ME, Gershenzon J, Croteau RB., 2000.** Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*, 122, p215-224.
- McDonald ST, Bolliet DA, Hayes JE. , 2016.** Chemesthesis : Chemical Touch in Food and Eating. Wiley-Blackwell, 312.
- Meierhenrich U. J., Golebiowski, J., Fernandez, X., & Cabrol-Bass, D., 2005.** De la molécule à l'odeur. *L'actualité Chimique*, (289), p29–40.
- Mengal P, Mompon B., 1994.** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet international, WO 94/26853.
- Meullemiestre A, Breil C, Abert-vian M, Chemat F., 2015.** Modern Techniques and solvents for the Extraction of Microbial Oils, *SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability* p 52.
- Meziane B., 2017.** Les coléoptères saproxyliques des Monts d'Ouarsenis(Nord-Ouest Algérien):cas du Parc National de Theniet El Had. Thèse de doctorat. UNIVERSITE ABOU-BAKR BELKAID TLEMCEN.
- Mighri H, Ahmed Akrouf A, Casanova J, Tomi F and Mohamed Neffati M., 2009.** Influence of Drying Time and Process on *Artemisia herba-alba* Asso Essential Oil Yield and Composition *Jeobp* 12 (3) 2009 p 358 – 364.
- Miles E., 2013.** Les huiles essentielles pour les nuls, First Editions.
- Millard B.J., 1978.** *Quantitative mass spectrometry*. London: Heyden.
- Mnayer D., 2014.** Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de doctorat.Univ d'avignon et des pays de vaucluse. p11-17.
- Mohapatra DP, Thakur V, Brar SK., 2011.** Antibacterial efficacy of raw and processed honey. *Biotechnology Research International*, 1-6. Naturels par micro-ondes. Brevet international, WO 94/26853.

- Möller K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO. P 152.
- Moretti M., Conedera M., Moresi R. & Guisan A., 2006.** Modélisation de l'influence du changement de régime des feux sur la distribution locale d'une espèce végétale méditerranéenne pyrophytic (*Cistus salviifolius*) à sa limite septentrionale. *Journal de Biogéographie*, 33 (8): p1492-1502.
- Mouton Y., Bingen E., Deboscker Y., et Dubreuil L., 2000.** Antibiotiques antiviraux anti-infectieux. *Edition: John LibbeyEurotext*, Paris.2-7420-0308-8.
- Mrabet N, Lahlou H and Benjlali B., 1999.** Effect of Moroccan *Cistus ladaniferus* L. (rockrose) extracts on the growth of four fungi, *Cryptogam Mycol.* 20, p23-33.
- Mulcahy L R, Isabella V M and Lewis K., 2014.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol* 68: p1-12.
- Muller J, Heindl A., 2006.** Drying of medicinal plants. In. R.J. Bogers, L.E. Cracker and D. Lange (eds), *Medicinal and Aromatic Plants*, p. 237-252, Springer, Netherland.
- Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover R.H., 2003.** *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon VA, United States of America :American Society for Microbiology.
- Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A., 2007.** *Manual of Clinical Microbiology*, 9.Ed. American Society of Microbiology Press.
- Muther L., 2015.** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université d'Auvergne.
- Muylaert A, Mainil JG. 2012.** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Medecine Veterinaire*, 156, p109-123.
- Naves Y R., 1976.** Parfums, Cosmétiques, savons, Vol. 58, p. 105. Cité in GARNERO J., 1996 : Huiles essentielles. *Techniques de l'ingénieur K345* p 1-45.
- Neffati A., 2010.** Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*.
- Nerio L S , Olivero-Verbel J, & Stashenko E., 2010.** Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), p372–378.
- Nicholas H.J., 1973.** *Phytochemistry Organic Metabolites*, Yonkers, , New York. Vol. 2.
- Nicolas Garnier & Elisabeth Dodinet., 2013.** An Offering of *Cistus* (Rock Rose) found in a Carthaginian Tomb (6th-5th c. BC): An Interdisciplinary Approach Combining

Archaeobotany and Biomolecular Archeology ArcheoSciences, revue d'archéométrie, 37, p 51-66.

- Nixon M, & McCaw M, 2001.** The Compleat distiller. New Zealand: The Amphora Society. The Amphora Society PO Box 51-231 Pakuranga Auckland 1706 New Zealand. ISBN 0-473-08135-0
- Ntezurubanza L., 2000.** *Essential oils of Rwanda*. LASEVE, University of Québec, Chicoutimi, Canada., p247.
- Oke F, Belma , Sahlan O, Senol A., 2009.** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry 112 : p874–879
- Okoh OO, Sadimenko AA, Afolayan AJ., 2007.** The effects of Age on the yield and
- Oliva d I M, Beltramino E, Gallucci N, Casero C, Zygadlo J, Demo M., 2010.** Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales*, 9, p29-37.
- Oller-López J L, Rodríguez R, Cuerva J M, Oltra J E, Bazdi B, Dahdouh A, Lamarti A, Mansour A I., 2005.** Composition of the essential oils of *Cistus ladaniferus* and *C. monspeliensis* from Morocco. *J. Essent. Oil Res.* 17, p553–555.
- Olsen S J, R Bishop, F W Brenner, et al., 2001.** The changing epidemiology of salmonella: Trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. *J Infect Dis.* 183: p753–761.
- Oussou K R., Kanko C., Guessennd K N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'guessan Y T., Figueredo G., Chalchat J.-C., 2004,** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. *C. R. Chimie*, 7(10-11), p1087-1086.
- Pacheco F V, Avelar R, Alvarenga I C A, Bertolucci S K V, Alvarenga A A, Eduardo Brasil Pereira Pinto J., 2016.** Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. *Industrial Crops and Products* 85 .p251–257.
- Pagoula F, Baser KHC, Kurkcuoglu M., 2000.** Essential oil composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from Mozambique. *Journal of Essential Oil Research*, 12, p333-335.

- Palà-Paül J, Perèz-Alonso MJ, Velasco-Neguerela A, Palà-Paül R, Sanz J, Conejero FCO., 2001.** Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, p663-672.
- Palumbi SR., 2001.** Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293:1786–90.
- Paolini J, Tomi P, Bradesi P, Casanova J, Kaloustian J., 2008.** Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and ¹³C NMR spectroscopy. *Nat. Prod. Res.* 22, p1270–1278.
- Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S and Kanellis AK., 2014.** Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem*;2(35):1-19.
- Pauli A et Schilcher H., 2010.** *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Hüsnü C. B. K. et Gerhard B. New York: USA, Taylor & Francis.
- Pavela R., 2008.** Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 102 .555-559.
- Peer WA, Langenheim JH., 1998.** Influence of phytochrome on leaf monoterpene variation in *Satureja douglasii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, p 25-34.
- Perillaud M., 2018.** Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles de plantes aromatiques du maquis corse. Thèse de doctorat. Univ de LILE. p37.
- Peron L and H Richard., 1992.** Epices et aromates, techniques et documentations Lavoisier.
- Peters B M, Shirliff M E, and Jabra-Rizk, M A., 2010.** Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 6, e1001067.
- PEYRON L., 2002.** Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. *Cité In Dugo G. And Di Giacomo A., 2002 : Citrus, the Genus Citrus. Edition Taylor and Francis.* p642.

- Pharmacopée européenne, 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps).
- Pibiri M.C., 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. *Thèse de doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne. France.*
- Piggot P.J., 2009.** «*Bacillus subtilis*», In *Schaechter M*; Piggot P J. (Eds), Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, San Diego, CA, USA, p154-165.
- 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. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18, p73–78.
- Pingret D, Fabiano-Tixier A.-S, et Chemat F., 2013.** Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), p593–606.
- Piochon M., 2008.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. *Mémoire. Université du Quebec à Chicoutimi. Canada, 200p.*
- Pirali-Kheirabadi K., da Silva J.A.T., 2010.** Lavandulaangustifolia essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control, *Experimental Parasitology*.
- Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, et al., 2003.** Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol*; 41: 1192-202.
- Pistelli L., Reidel R, Parri F, Morelli E et Pistelli L., 2018.** Chemical composition of essential oil from plants of abandoned medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus Crop & Prod.* 77. p795-802.
- Pnteh., 2018.** Parc Nationale de Thniet El Had, Tissemsilt, Belkaid boualam, chargé de valorisation des espèces végétales. Recommandations 2012. Consulter le 17/06/2013 sur: <http://www.sfm-microbiologie.org/>.
- Pocidalo J J., 1989.** Des infections d'origine microbiennes ou virale. In: Brisset C et Stoufflet J (Directeurs) Santé et médecine, l'état des connaissances et des recherches. Editions LaDécouverte / INSERM / ORSTOM.

- Polat R and Satil F., 2012.** An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir—Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 2: p626–641
- Politeo O, Maravić A, Burčul F, Carev I and Kamenjarin J., 2018.** Phytochemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Wild Growing *Cistus* species in Croatia. *Natural Product Communications* Vol. 13 (6). p771-774.
- Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, Roura SI. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Food Science and Technology*, 36, p679-684.
- Poolman B, Driessen A J M, Konings W N., 1987.** Regulation of solute transport in Streptococci by external and internal pH values. *Microbiol. Rev.* 51, 498–508.
- Popi., 2003.** Maladies infectieuses. Paris : CMIT. p185-224.
- Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS., 2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr A*, 1163(1-2), p2-24.
- Prates H T, Santos J P, Waquil J M, Fabris J D, Oliveira A B, Foster J E., 1998.** Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhizopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 34(4), p243–249.
- Putri D, Kusuma H, Syahputra M, Parasandi D and Mahfud M., 2017.** The extraction of essential oil from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using microwave hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. doi:10.1088/1755-1315/101/1/012013.
- Quer PF., 2005.** Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Ediciones Península.Barcelona, 1999. Obra clásica, lista extensa de plantas medicinales (incluidoshongos) con descripciones de las plantas y sus usos.
- Quezel P & Santa S., 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. Ed. C.N.R.S. Paris, p571-1170.
- Raiss A., 1998.** Les lavandes de la région de Khemessat : Contribution à l'étude de quelques facteurs affectant les rendements et la qualité de leurs huiles essentielles, Mémoire de 3e cycle agronomique option : Industries Agricoles et Alimentaires ; I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.

- Ramanoelina P A R , Bianchini J P , Andriantsiferana M , Viano J , Gaydou E M., 1992.** Chemical composition of niaouli essential oils from Madagascar. *J. Essent. Oil Res*, 4(6), p657-658.
- Rameau J C., Mansion D., Dumé G., Gaubreville C., Bradat J., Bruno E., Keller R., 2008.** Flore forestiere francaise : guide écologique illustré 3.Ed Institut pour le développement forestier, C.N.P.P.F., Paris, p2426.
- Rauha J P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Khkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P., 2000.** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol*, 56, p3–12.
- Raynaud, C., 1987.** *Atlanthemum* Raynaud, un nouveau genre pour la famille des Cistaceae. *Anales Jard. Bot. Madrid.*, 44 (2), p309-317.
- Razafindrakoto B S., 1988.** Huiles essentielles d'*Eucalyptus* de Madagascar ; Variabilité de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte; essais de classement chemotaxonomique et propriétés pharmacodynamiques. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, p225.
- Rebaya A, Iguel Belghith S, Hammrouni S, Maaroufi A, Trabelsi Ayadi M, Chérif J K., 2016.** Antibacterial and Antifungal Activities of Ethanol Extracts of *Halimium halimifolium*, *Cistus salviiifolius* and *Cistus monspeliensis*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* ; 8(4): p243-247.
- Rebaya A, Belghith S I, Cherif J K, Trabelsi-Ayadi M., 2016.** Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Rokrose (*Cistus salviiifolius*) Leaves and Flowers Grown in Tunisia *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2016; 8(2); p327-331.
- Remmal A, Tantaoui-Elaraki A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M. 1993.** Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), p1179-1184.
- Rhayour K., 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, p170.
- Richard H, 1992.** Epices et aromates. *Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, p339.
- Richard H., 1992.** Connaissance de la nature des arômes. In H. Richard & J. L. Multon (Eds).Les arômes alimentaires. (pp. 21-37). Paris: Tec et doc-Lavoisier:APRIA.

- Riet-Correa F, Barros S S, Méndez M C, Gevehr-Fernandes C, Neto P O A, Soares M P, et al., 2009.** Axonalde generation in sheep caused by the ingestion of *Halimium brasiliense*. *J. Vet.Diagn.Invest.* 21, p478–486.doi: 10.1177/104063870902100408.
- Robles C, Bousquet-Me'lou A, Garzino S, Bonin G., 2003.** Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: p339–343
- Rol R, Jacamon M., 1968.** Flore des arbres, arbustes et arbrisseaux III. Région méditerranéenne. Ed. La Maison Rustique, Paris, p92.
- Romdhane M, Tizaoui C., 2005.** The kinetic modeling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, p759-766.
- Rout P K, Rao Y R, Sree A, Naik SN., 2007.** Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murrarya paniculata* (Linn.) Jack flowers. *Flavour Fragr. J.* 22 : p352 - 357.
- Russel A D., 1991.** Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology.* 71(3): p191-201.
- Safaei-Ghomi J , Ahd AA., 2010.** Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag* 2010; 6:172-5.
- Safaralie A, Fatemi S and Sefidkon F., 2008.** Essential oil composition of *valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran Comparative analysis between supercritical CO2 extraction & hydrodistillation. *Journal of chromatography A.* 1180:159.
- Samate AD., 2002.** Compositions chimiques des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso. Thèse de Doctorat, Université de Ouagadougou.
- Sanders P., 2005.** « L'antibiorésistance en médecine vétérinaire. Enjeux de santé publique et de santé animale », *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, vol. 2, 158, p137-143.
- Sangwan NS., Farooqi A H A., Shabih F., Sangwan R S., 2001.** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34, p3–21.
- Sayah K, Chemlal L, Marmouzi I, El Jemli M, Cherrah Y, My El Abbes F., 2017.** In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salviifolius* (L.) and

- Cistus monspeliensis (L.) aqueous extracts. South African Journal of Botany 113 (2017) p160–163.
- Schachter M, Medoff G, Eisenstein B I., 1999.** Microbiologie et pathologie infectieuse. Ed: De Boeck et Larcier, p81,181.
- Scheffer J J C., 1996.** Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*; 10:S6-S7.
- Schwedt G., 1993.** Méthodes d'analyse, Ed. Flammarion.
- Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z and Ahmadi S., 2007.** The effect of distillation methods and stage of plant growth n the essential oil content and composition of *Satureja Rechingeri* jamzad. *Food chemistry*. 100: p1054-1058.
- Seguin E., 2001.** Le préparateur en pharmacie « Botanique-Pharmacognosie - Phytothérapie - Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. p208.
- Sell C., 2010.** Chemistry of Essential Oils. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Hüsnü C. B. K. etGerhard B. New york: USA, Taylor & Francis: p121–150.
- Senatore F., Arnold NA., Piozzi F., 2004.** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A*.1052 : p237-240.
- Shahpour khangholi & Ayotollah Rezaeinodehi., 2008.** Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Aremisia annua*) Growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (6) : p934-937.
- Shin S, Kim J H., 2005.** In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.*, 28, p897-901.
- Shubin Wu, Gaojin Lv and Rui Lou., 2014.** Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. *South China University of Technology, China*
- Singh S, Barrett JF., 2006.** Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology* Volume 71, Issue 7, 30 March 2006, Pages 1006-1015
- Singleton P., 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. *Éd DNOD*. 15: p447-454.

- Skandamis P.N., Nychas G.J.E., 2001.** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, **91**(6), p1011-1022.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA., 2003,** Principes d'analyse instrumentale, *1ère édition*, De Boeck, p945.
- Smallfield B M., John W. van Klink., Nigel B. Perry., and Kenneth G. Dodds., 2001.** Coriander Spice Oil: Effects of Fruit Crushing and Distillation Time on Yield and Composition. *J. Agric. Food Chem*, **49**, p118-123.
- Sparkman O D., 2000.** Mass Spec Desk Reference. Global view publishing.
- Spendlove J C, Fannin K F., 1983.** Source, significance, and control of indoor microbial aerosols : human health aspects. *Public Health Reports*, **98**, 3, 229.
- Springman AC, Lacher DW, Milton GWN, et al., 2009.** Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol* **191**:5419–27.
- Stagliano M., 1992.** Actifs et additifs en cosmétologie, techniques et documentations Lavoisier.
- Stefanini M B., Ming L C., Marques M O M., Meireles M A A., Moura L S., Marchese J A., 2006.** Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* Var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. PI. Med, Botucatu*, **8**, p86-90.
- Suetsugu T., Tanaka M., Iwai H. et al., 2013.** Supercritical CO₂ extraction of essential oil from Kabosu (*Citrus sphaerocarpa* Tanaka) peel. *Flavour*, **2**, 1.
- Talbaoui A, Jamaly N, Aneb M., 2012.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *J Med Plants Res* **6**:4593–600.
- Tanko H, Carrier DJ, Duan L, clause E., 2005.** Pre- and post-harvest processing of medicinal plants. *Plant Genet. Resour.*, **3**(2): p304-313.
- Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas J E., 2000.** Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res. Int.* **33**, p273–280.
- Taveira FSN, de Lima WN, Andrade EHA, Maia JGS., 2003.** Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla, *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, p69-75.
- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K., 2002.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: p3133-3141.

- Teuscher E, Anton R, Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec&Doc, Lavoisier, Paris, p105.
- Tidjani B., 2016.** Impact d'une phase bactérienne sur la dissolution d'un polluant résiduel en milieu poreux. Thèse de doctorat p82-100.
- Tomás Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalán E, Roldán-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V., 2013.** Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology* ; 55 : p313–322.
- Tongnuanchan P, Benjakul S., 2014.** Essential Oils : Extraction, Bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79, 1231-1249.
- Touhami A., 2017.** Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Thèse de doctorat. Univ BADJI MOKHTAR ANNABA
- Traldi P, Magno F, Lavagnini I et Seraglia R., 2008.** Quantitative applications of mass spectrometry. tapa blanda, 152 páginas, ISBN 9780470025161.
- Trumpower BL, Gennis R B., 1994.** Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 675–716.
- Turina A D V, Nolan M V, Zygadlo J A, Perillo M A., 2006.** Natural terpenes: Self-assembly and brane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, p101–113.
- Ultee A, Bennik M H, Moezelaar R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, p1561–1568.
- Ultee A, Kets E P W, Alberda M, Hoekstra F A, Smid E J., 2000.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol*, 174, 233–238.
- Ultee A, Smid E J., 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64, p373–378.
- Valnet., 2003.** *Les huiles essentielles, une santé toute naturelle.* Phytothérapie de la recherche à la pratique. 1(1), 12.

- Vasconcelos Silva M G, Craveiro A A, Abreu Matos F J, Machado M I L, Alencar J W., 1999.** Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia*. 70, p32-34.
- Veillet S, Tomao V, & Chemat F., 2010.** Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), p905–911.
- Vekiari S A, Protopapadakis E F, Papadopoulou P, Papanicolaou D, Panou C, Vamvakias M., 2002.** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(1), p147-153.
- Verdeguera M, M Amparo B and Herminio B., 2012.** Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cis-tus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*. Vol. 26, No. 17 : p1602–1609.
- Viciolle E., Castilho P, Rosado C., 2012.** In vitro and in vivo assessment of the effect of *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* 34, p546–550.
- Vilas-Boas G, V Sanchis, D Lereclus, M F L Lemos, and D Bourguet., 2002.** Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: p1414–1424.
- Viljoen A M, Denirci B, Baser KHC, Potgieter C J, Edwards T J., 2006.** Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72:99-104.
- Vincent M.C., 1991.** L'aromatogramme. *Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie*. 4, Paris 6
- Viuda-Martos M, Sendra E, Pérez-Alvarez J A, Fernández-López J, Amensour M, Abrini J., 2011.** Identification of flavonoid content and chemical composition of the essential oils of Moroccan herbs: myrtle (*Myrtus communis* L.) rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *J. Essent. Oil Res.* 23, p1–9.
- Vokou D., Kokkini S., Bessiere JM., 1993.** Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 21, 287–295.

- Vosylius S, Sipylaite J, Ivaskevicius J., 2003.** Intensive care unit acquired infection : a prevalence and impact on morbidity and mortality. *Acta Anesthesiol Scand*; 47: p1132-1137.
- Werdin González J O, Gutiérrez M M, Ferrero A A, Fernández Band B., 2014.** Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, p130–138.
- Wichtel M et Anton R., 1999.** Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques, Ed. Tec et Doc.
- Wijsekara ROB, Ratnatunga C M, Durbeck K., 1997.,** The distillation of essential oils. Manufacturing and plant Construction Handbook. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs & Agriculturak Products.
- Willem J.P., 2009.** *60 maux soignés par les huiles essentielles : l'aromathérapie au quotidien pour toute la famille, Les minipockets de santé.*
- Wilson M., 2010.** Huiles essentielles pour la cuisine et le bien-être. [Montréal]: Fides.
- World Health Organization., 2001.** Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: a systematic review of the literature. Geneva, World Health Organization.
- Yang F L, Liang G W, Xu Y. J, Lu Y-Y, Zeng L., 2010.** Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. *Journal of Stored Products Research*, 46(2), p118–123.
- Yayi E, Gbenou J D, Ahoussi L A , Moudachirou M , Chalchat JC., 2004.** *Ocimum gratissimum* L., Siège de variation chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie*, 7 :1013-1018.
- Yeruham I, Orgad U, Avidar Y, Perl S, Liberboim M, Adler H etal., 2002.** A urinary retention syndrome in beef cows probably caused by ingestion of *Cistus salvifolius*. *Rev.Méd.Vét.* 153, p627–634.
- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y and Y Takaishi Y., 1995.** Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains, *J. Ethnopharmacol.* 46, p133-152.
- Zhiri A, Baudoux D., 2005.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg. P:8
- Zhiri A., Baudoux D., Breda ML., 2013.** Huiles essentielles chémotypées, J.O.M,

- Zitouni F., 2010** Etude des associations mycorhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. Mémoire de Magister en Biotechnologie. Univ d'Oran. P68.
- Zrira S & Benjilali B., 1991.** Effect of Drying on Leaf Oil Production of Moroccan *Eucalyptus camaldulensis* , Journal of Essential Oil Research, 3:2 : 117-118.
- Zrira S., 1992.** Les huiles essentielles d'eucalyptus du Maroc: Fac-teurs influençant la productivité et la qualité de ces essences. Investigations sur les possibilités d'exploiter l'*Eucalyptus camaldu-lensis* pour la production d'huile essentielle d'*Eucalyptus* à cinéole; Thèse de doctorat ès-sciences agronomiques; I. A. V. Hassan II ; Rabat, Maroc.

Annexes

Annexe 1

Loi de Dalton

La pression de vapeur P sur une solution est égale à la somme des tensions de vapeur des constituants P_i .

$$P = \sum_i P_i$$

Sous l'hypothèse d'un comportement idéal, la pression de vapeur de constituants est définie par la loi de Raoult :

$$P_i = y_i P = x_i P_i^0$$

Où x_i et y_i sont les fractions molaires de composant i dans la phase liquide et gaz, respectivement, et P_i^0 est la tension de vapeur saturante du composant i pur à la température donnée. Donc le rapport molaire de l'huile et l'eau entraînée s'exprime :

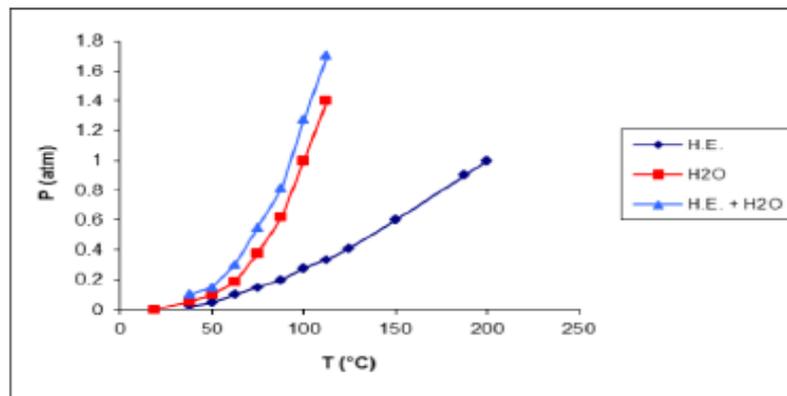
$$\frac{n \text{ moles huiles}}{n \text{ moles eau}} = \frac{P_h}{P_e} = \frac{y_h}{y_e} = \frac{x_h P_h^0}{x_e P_e^0}$$

Le rapport massique R est donné par :

$$R = \frac{P_h M_h}{P_e M_e}$$

Où M_i sont les masses molaires.

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange « eau + huile essentielle » distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (généralement voisine de 100°C en raison de la faible tension des constituants aromatiques volatils) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées.



Evolution des températures de distillation de l'eau et de l'huile essentielle ainsi que du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu.

Annexe 2

Milieux de culture

Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml
pH= 7,3 ± 0,2	

Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

Extrait de viande.....	3g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	1g
Eau distillée.....	1000 ml

Publication

**REGULAR ARTICLE**

Study of the chemical composition, antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus Salviifolius* from Tissemsilt National Park (Algeria) and influence of the drying period in the shade on the yield of this oil

Meharrar Nadjet^{1/2*}, Bekada Ahmed Mohamed Ali¹, Dris Ibrahim^{1/2}, Jacques Dommes³, Arabi Abed⁴, Larbi Aek⁵

¹Agronomy and Environment laboratory, University center of Tissemsilt, Algeria

²Laboratory of Food Technology and nutrition, University Abdelhamid BnBadis of Mostaganem, Algeria

³Laboratory of Plant Molecular Biology and Biotechnology, University of Liège, Belgium

⁴Laboratory of microbiology and plant biology, University Abdelhamid BnBadis of Mostaganem, Algeria

⁵Laboratory of Chemistry, University Ibn Khaldoun of Tiaret, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 16 Sep 2019

Revised: 15 Nov 2019

Accepted: 29 Nov 2019

***Corresponding Author:**

Email: nadjet.meharrar@yahoo.fr

Telephone: +213 668616455

Keywords: *Cistus salviifolius*; essential oil; drying; yield; chemical composition; applications

ABSTRACT

The genera *Cistus* present groups of about twenty species of shrubs belonging to the Cistaceae family are very common throughout the Mediterranean region. *Cistus salviifolius*, known as Melliya is a species of this genus that occurs in the forest region of Mount Ouarsenis (northwest Algeria), exactly in Thniet El Had National Park in the Wilaya of Tissemsilt. This study was undertaken to evaluate the antibacterial effects of *C. salviifolius* and its chemical composition in addition the effect of shade drying time on essential oil yield in order to optimize this parameter which is most often not controlled for producers. The optimal yield recorded is about $0.07 \pm 0.02\%$. Its characterization by gas chromatography coupled with mass spectrometry shows a dominance of hydrocarbon compounds. The minimum inhibitory concentration (MIC) is established using 6 strains of Gram-positive and negative bacteria. The antibiotic susceptibility test is performed using the gilliose-environment diffusion method, a bacterial suspension is prepared and subsequently well homogenized. Opacity must be adjusted to 0.5 McF (McFarland), from a young exponential culture (18 to 24 hours). The antimicrobial activity of *C. salviifolius* EO was tested against three Gram-positive and three Gram-negative bacteria. In fact, a strong inhibitory and bactericidal effect has been demonstrated against all Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. It appears from this study that the EO of *C. salviifolius* has a very high antimicrobial activity, it shows a wide spectrum covering Gram positive and Gram negative bacteria. Taking into account the results of this study, new antibacterial agents could be developed and the use of *C. salviifolius* should be encouraged in the pharmaceutical and perfumery industries.

1. Introduction

Medicinal plants are of great importance for the health of the population (Edeoga et al., 2005). They

have been used in traditional medical treatments for centuries (Arabi et al., 2017). Some researchers suggest that two thirds of the world's plant species have a medicinal value (Duduku. et al., 2011) Knowing that since ancient times, plants have been considered a rich source of effective and safe medicines (Sudhanshu, 2008). Indeed, the therapeutic virtues of medicinal and aromatic plants have been experimented for centuries as well as the valorization of their essential oils in different applications (EL-Akhal., 2014). The Cistaceae family, known as the cistus, is composed of eight genera and 175 species, includes the genus *Cistus*, which includes about twenty species of shrubs that are highly responsive throughout the Mediterranean semi-arid ecosystem (Tomas-Menor et al., 2013).

The majority of the species in this family, which is distinguished by its fragrance and sweet smell, are highly valued in perfumery (Ben Jemia et al., 2013; El Euch et al., 2015). These plants are able to grow under difficult conditions (Agnieszka. et al., 2008). The genus *Cistus* includes several medicinal plants used in traditional medicine to treat several diseases including high blood sugar and diabetes (Polat et al., 2012). These include *Cistus salviifolius* (Sayah et al., 2017), which is a widespread Mediterranean shrub found in a wide variety of environments. Given the degree of habitat differentiation, the geographical isolation of certain populations, the adaptation to local conditions and therefore the adaptation to the environment. (Farley et al., 2009). This species, like other rockrose species, grows in uncontaminated areas, but is also well adapted to areas subject to environmental disturbances such as recurrent fires and mine contamination (Abreu., 2012)

The constituents of *C. salviifolius* also activate receptors which are activated by peroxisome proliferators and stimulate the absorption of enadipocyte glucose (Kühn et al., 2011), also it presents a source of metabolites that can be used in human health care. especially as astringent and healing (El Euch et al., 2015). Haouat et al., (2013) have demonstrated that this plant has a higher anti-mycobacterial activity. Despite its importance, research on the chemical composition, as well as the antibacterial effect of *C. salviifolius* essential oils, is not very abundant in Algeria. For this reason, the aim of this study is to provide in-depth chemical knowledge of this species by identifying the chemical composition of the essential oils of this plant, as well as testing their antibacterial effect, and to evaluate

the effect of the drying period on the yield of essential oils in order to optimize this parameter.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of plant material

The leaves and branches of *C. salviifolius* were collected during flowering periods in the wilaya of Tissemsilt on 10/04/2017 in Thniet El Had National Park located between the geographical coordinates: X1=2°18' East X2=1°52' 45" East Y1=35° 49' 41" North Y2=35° 54' 44" North (X: latitude Y: longitude).



Figure 1: *Cistus salviifolius* located at the national park of thniet el had tissemsilt.

2.2. Methods for studying the drying effect

After the harvest of the plant, the leaves and branches have been cleaned, purified from any foreign element and the plant is dried in the laboratory at room temperature. The experiment takes place in May 2017. The first extraction is done on the fresh plant, the second is done 24 hours later. The other extractions are performed during a 24-hour interval.

2.3. Isolation of the essential oil

The essential oil obtained was dried on anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) (Al - Jaber., 2012).

The yield is calculated from the weight of the essential oil in relation to the weight of the dried plant used in hydrodistillation (Putri., 2017).

$$y = \frac{\text{MeO}}{\text{Mvd}} \times 100$$

Y: the yield in essential oil (%)

MeO: Mass of the essential oil (g)

Mvd: Dry vegetable mass (g)

Then the essential oil obtained is stored in amber glass vials at 4°C (Oke.F et al., 2009).

2.4. Analysis of essential oil by gas chromatography/mass spectrometry

The GC-MS analysis was performed on a 7890A gas chromatograph. equipped with a 5975C Plus mass spectrometer (Agilent, American). Agilent technology with HP-5 ms fused silica capillary (5% phenyl methyl siloxane) column (30 m×0.25 mm diameter, film thickness 0.1m) was used for the separation.

The injector temperature was 150°C and the detector temperature was 250°C.

The initial temperature was maintained at 100° C for 4 min, then gradually increased to 130° C at a rate of 5° C/min and 5° C/min, then held for 20 min at 130°C

The carrier gas was helium with a linear velocity of 1.2 mL.min⁻¹ at a fractionation ratio of 30:1; injection volume: 0.2 µL

Identification of the different compounds by comparing the mass spectrum and retention indices (RI) of authentic samples with those provided in the publications (Adams.R., 2007). The quantification of the relative quantity of each compound was performed as a function of the percentage of surface area, without taking into account the calibration factor.

2.5. Determination of antibacterial activity

The evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of *C. Salviifolius* leaves was performed against 3 Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and 3Gram-negative (*Salmonella* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E.Coli* 25922).

For antibacterial tests, all bacterial stains were subjected to a growth culture for 24 hours at 37°C; a bacterial suspension was prepared and then well homogenized with an opacity of 0.5McF (McFarland).

2.6. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

For inhibition tests of essential oil *C.salviifolius* against the bacteria tested These were performed with Mueller-Hinton agar mentioned in previous studies (Essid et al., 2015).

The minimum inhibition concentrations (MICs) were determined by the serial dilution method described by TM.(Chaouche et al., 2016).

3.Results and Discussion

3.1. Extraction of essential oils of *C. salviifolius*

After 3 hours of hydrodistillation of 80g of vegetable matter, we obtained the quantities of essential oils and therefore the extraction yield (R) is calculated with the formula :

$$y = \frac{\text{EssentialOilMass (g)}}{\text{UsedVegetalMatterMass (g)}} \times 100$$

The average yield of the essential oil extracted from the leaves of *C. salviifolius* was 0.07 (± 0.02%).

This value is in line with the results demonstrated in a population examined in Greece (Demetzos et al., 2002) and the yields obtained by Loizzo et al.,2013.and E. Fanourioua et al., 2018

However, our value remains lower than the recorded yield of a population of the same species and in the same region, which were respectively between 0.1 and 0.44% (Demetzos et al., 2002).

Our values correspond to the results of Mastino et al., (2016) who also indicated that the dried plant has a higher profitability than the fresh plant.

3.2 Influence of the effect of shade drying time on the essential oil yield.

From the results obtained (Figure2), we can clearly see the effect of drying on the extraction yield of essential oils.

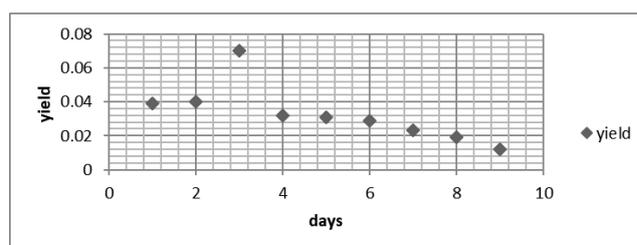


Figure 2: Change in yield as a function of drying time.

The maximum yield of essential oils from the aerial part of *C.salviifolius* is about 0.07% recorded on the third day of drying.

Drying the plant before it is distilled as a treatment that has a net effect on the yield of essential oil. Several studies have been carried out on this issue and they have confirmed a general phenomenon.

The yield of essential oil expressed in relation to the dry matter changes during the drying of the plant material before its distillation, this yield begins in a first phase with a very clear increase then it reaches a maximum (0.07% ± 0.02%) during the

second phase after it decreases regularly.

Mastino et al., (2017) also indicated that the dried plant has a higher profitability (about 0.592%) compared to the fresh plant (0.136%).

The optimal level of yield and the duration of the first phase are related to the plant species and the drying conditions used (direct sun drying or natural air drying). This finding was confirmed for *Teucrium polium* (Bencheikh et al., 2015), For *Verbena* (Bélanger et al., 1993), *Eucalyptus* (Zrira., 1992; Zrira et al., 1991), in addition El Amrani confirmed the same observation for rosemary (1999).

In the search for the understanding of this phenomenon and after having verified several hypotheses it has been shown that it is a biological phenomenon because the plant, after its harvest continues to live and the biosynthesis of essential oils, continues and accelerates,

This is at the origin of the increase in its activity of biosynthesis of terpenes and derivatives.

It is a plant's defence against water stress (Zrira et al., 1991). This is the reason for the increase in essential oil yields during the first phases.

After the final death of the plant, all biosynthesis activity stops and losses of essential oils by evaporation are no longer compensated, hence the decreases in distillation yields due to the reduction or cessation of enzymatic activity causing cell death due to high dehydration

3.3. GC-MS Composition of *C. salviifolius* oil

The results of the analysis of the chemical compounds of essential oils via GC-MS indicated that a total of 39 components were identified. Table 1 shows the chromatogram of the oil of *C. salviifolius*.

The main components identified were Camphor (13.2%), trans-ferruginol (10.6%), ethyl hexadecanoate (5.6%), caryophyllene oxide (4.4%), α -eudesmol (4.1%), tetradecanoic acid (3.4%), longiborneol, epi dehydro abietol, N-docosane with a percentage of 3.2.

This oil in previous studies was very rich in sesquiterpenes (12.5% hydrocarbons, and oxygenates (31.5%) with a rather complex profile. Among sesquiterpenes the main one was germacrène D (9.1%), in Tunisia (Loizzo et al., 2013).

Demetzos et al.,(2002) in Greece suggest that es-

PIC	RI	COMPOSANTS	%
1	1100	nonanal	0.7
2	1143	Camphor	13.2
3	1165	neo-mentho	0.4
4	1183	1- α -terpineol	0.7
5	1290	thymol	0.4
6	1298	carvacrol	0.5
7	1351	iso-neo carvomenthyl Acetate	0.9
8	1395	Trimnal	1.8
9	1401	methyl eugenol	0.5
10	1453	geranyl acetone	0.3
11	1460	cis-muuroala-4(14),5- diene	0.2
12	1461	allo-aromadendrene	0.1
13	1495	α -muurolene	0.2
14	1513	γ -cadinene	0.1
15	1532	cadina-1,4-diene	0.2
16	1549	elemol	0.3
17	1584	β -copaen-4-ol	1.0
18	1581	caryophyllene oxide	4.4
19	1590	Viridifloro	0.1
20	1592	longiborneol	3.2
21	1573	dodecanoic acid	1.31
22	1627	epi-cubenol	0.5
23	1641	α - epi-muurolol	1.8
24	1645	α -muurolol	0.6
25	1652	α -eudesmol	4.1
26	1653	α -cadinol	1.3
27	1649	β -eudesmol	0.9
28	1676	n-tetradecanol	0.5
29	1762	benzyl benzoate	1.2
30	1777	tetradecanoic acid	3.4
31	1978	ethyl hexadecanoate	5.6
32	2090	octadecanol	0.2
33	2100	heneicosane	0.8
34	2200	N-docosane	3.2
35	2259	epi dehydro abietol	3.2
36	2271	3 β -hydroxy- manoyl oxide isomer	1.3
37	2325	trans-ferruginol	10.6
38	2357	trans-ferruginyl acetate	2.7
39	2278	Cis- totarol	2.8

Table 1: Chemical composition of the essential oil.

essential oils were characterized by high percentages of sesquiterpenes, especially oxygenated sesquiterpenes.

Pistelli et al., (2018) also reported a higher content of oxygenated sesquiterpenes (38.1%) in the essential oil composition of three spontaneous species of *C. salviifolius* in an abandoned mine on Elba Island and less non-terpenes (16.5%, NT) than the sample taken.

53 components (81.27% of the oil) were detected in the essential oil described in the results obtained by Mastino et al.,(2017) in Sardinia which showed a high amount of norisoprenoids (10.44%),

In Croatia, the analysis of the essential oil of the leaves of this plant made it possible to identify pentadecanoic acid and hexadecanoic acid as the main compounds with a percentage of 18.1%, 14.1% respectively (Politeo et al., 2018).

In Spain, and with the aim of providing a complete characterization of the volatile profile of different cultivated *Cistus* plants, a system combining solid phase microextraction in the head space and gas chromatography coupled with mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) has shown the most abundant presence of camphor (43.86%) (Aránzazu et al., 2015).

With the exception of many species of *C.salviifolius* our results do not confirm the composition of the essential oil in a population studied by Demetzos et al., (2002) whose oxygenated monoterpenes have been detected with higher percentages than monoterpene hydrocarbons.

This composition was not the same in other species of the same genus *Cistus* whose α -pinene, β -pinene and gterpinene have the highest percentage. (Christine et al., 2002).

Although oxygenates take the largest amount (Verdeguer et al.,2012).

3.4. Antibacterial effect and MIC

The in vitro antimicrobial activity of selected essential oils against the micro-organisms used, was evaluated qualitatively and quantitatively by the presence or absence of inhibition zones, zone diameters and MICs.

After this incubation period, an observation with the naked eye was made to evaluate the antibacterial results against six bacterial spots and the lowest concentration for which no bacterial growth was observed corresponds to the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Kouadio et al.,2017).

The MIC of *C. salviifolius* essential oil has been tested at concentrations ranging from 5% to 0.156%, the results are presented in Table 2.

All bacteria tested were sensitive to the essential oil. However, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* were more sensitive than the other test bacteria with an inhibition zone corresponding to 24.70 and 23.60 mm, respectively.

The essential oil of *C. salviifolius* was found to be active against all bacterial strains, with the lowest

Bacteria	Diameter	CMI %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	23.60	2.20
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	12.00	1.10
<i>Bacillus.s.</i> ATCC 6633	16.07	0.80
<i>Salmonella</i> ATCC 14028	14.74	0.65
<i>E.Coli</i> 25922	09.00	0.45
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	24.70	2.25

Table 2: Diameters of microbial growth inhibition zones and minimum inhibitory concentration (MICs) obtained for pure EO.

average values on *Bacillus cereu*, *Bacillus.s*, *Salmonella* strains, with the average MIC= 1.10 - 0.80- 0.65- 0.45% respectively.

On the other hand, it is important to note that this essential oil was active against *Staphylococcus aureus* which was inubated at a concentration of 2.25% followed by *Pseudomonas aeruginosa* with a concentration of 2.20%.

According to Politeo et al., (2018), *C. salviifolius* EO showed slightly better activity (decrease of 2 times the IJC) against *S.aureus* ATCC 25923, MDR *E. coli* FSST07 which may be related to the presence of labdane-type diterpenes in EO (8.1%) composed of 13-epi-manool, oxide manoyl and oxide 13-epi-manoyl, while only 13-epi-manoyl (1.2%) was detected in EO from this plant.

The results concerning the antimicrobial activity of the three main chemotypes of *C.salviifolius* demonstrated by Demetzosa et al.,(2002) showed that staphylococcus were the most sensitive, while Gram negative bacteria were less inhibited.

The antimicrobial activity of the essential oil analysed can be attributed mainly to its majority component, in fact, Mahmoudi et al., (2016) attributed this antimicrobial activity against the activity of *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 3.1 mg/ml) to ethanol extract with 70% *C. salviifolius*.

Staphylococcus aureus 25923 and 29213 were the most inhibited by lyophilized extracts of this plant according to work done by Ayşegül et al., (2005).

4. Conclusion

On the basis of the above data, it can be concluded that the essential oil extracted from the leaves of *C. salviifolius* reveals a very low yield (of $0.07 \pm 0.02\%$) which depends on many factors, especially the drying time of the plant before it is distilled, which has been studied, so for an industrial operation, it is therefore appropriate to extract the essential oil

from the leaves of *C. salviifolius* about three days after their harvest, since the essential oil content would be at its maximum

GC/MS analysis revealed the major presence of sesquiterpenic carbides, other chymotypes have been characterized in previous studies this variation may be due to environmental conditions as well as climatic and soil conditions.

Through our study it has been shown that the essential oil of *C. salviifolius* was able to inhibit the growth of a wide spectrum of bacterial strains, known for their implications in human and animal infections. Its content of several active antimicrobial compounds and their likely interactions explain its bioactivity. Thus, this essential oil can be a promising agent to control microbial growth, and could well make it interesting for the perfumery and pharmaceutical industry respectively.

References

- Abreu M, Santo E, Ferreira M, Magalhães M (2012)** *Cistus salviifolius* a promising species for mine wastes remediation. *Journal of Geochemical Exploration* 113 : 86–93
- Adams R (2007)**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-mass Spectroscopy, Allured Publishing Corp, Carol Stream, Illinois, USA.
- Agnieszka S, David A, Dorota (2008)** Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*. ISSN 2544-2406 : 127–132
- Arabi A, Djibaoui R, Malihac C, Sisbane I, Lattab A, Bechelaghem N, Dahah H, Reziga C, Ettalhi M, Taleb F, Ouar Korichi M, Dahloum L (2017)** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* growing in Mostaganem Province (Algeria). *International Journal of Biosciences*. ISSN: 2220-6655 : 146-158
- Aránzazu M, Jose Oruna-Concha M, Stephen Elmore J, Enrique B, Vicente M, Cristina R, Antonio Segura C (2015)** Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. *Industrial Crops and Products* Volume 74 :425-433
- Aysegul G, Sulhiye Y, Ayse Mine O, Ceyda S, Maksut C, Gu'lderen Y, Toru O, and Yoshihito O (2005)** Antimicrobiological Studies on Turkish *Cistus* Species. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 43, No. 2 ; 178–183
- Bélanger A, Eddaouri M, et Benjilali B (1999)** La verveine, Effet du séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique ; Actes des 12ème Journées internationales des huiles essentielles, Digne-Les-Bains; Septembre
- Ben Jemia M, Kchouk M, Senatore F, Autore G, Marzocco S, De Feo V, Bruno M (2013)** Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *chemistry journal central* 47 : 1–7.
- Bencheikh S, Goudjil M, Zighmi S et Ladjel S (2015)** Effet du séchage sur le rendement des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp. *aurasianum* Labiatae. *annale des sciences et des technologies*. ISSN 2170-0672. Vol7.
- Christine R, Anne B, Suzanne G, Gilles B (2003)** Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31 : 339–343
- Putri D, Kusuma H, Syahputra M, Parasandi D and Mahfud M (2017)** The extraction of essential oil from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using microwave hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/101/1/012013
- Demetzos C, Dimitra A, Dimitrios P (2002)** A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology* 30 : 651–665
- Duduku K, Rosalam S and Rajesh N (2011)** A Review of the Antioxidant Potential of Medicinal Plant Species. *Food and Bioprocesses Processing*, 89 : 217-233
- Duru M (2003)** Effect of nitrogen fertiliser rates and defoliation regimes on the vertical structure and composition (crude protein content and digestibility) of a grass sward. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 : 1469–1479.
- Edeoga I, Okwu D and Mbaebie B (2005)** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal Plants *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (7) : 685-688
- El Amrani A (1999)** Le romarin du Maroc : Chimie, chimiotaxonomie, variabilité intraspécifiques. Effets de la période de récolte, du niveau de coupe et de la région sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle ; Doctorat en chimie organique, Université Hassan II ; Faculté des sciences Ben M'sik; Casablanca Maroc
- El Euch Sk, Bouajilac J, Bouzouita N (2015)** Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products* 76 : 1100–1105
- Elpida F, Dionissios K, Dimitra D, Petros T, Panayiotis T, Petros V, Garifalia E (2018)** Hippocratic medicinal flora on the Greek Island of Kos: Spatial distribution, assessment of soil conditions, essential oil content and chemotype analysis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*
- Essid R, Rahali F, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, Aoun K, Limam F (2015)** Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops and Products* 77 : 795–802
- EL-Akhal F, Guemmouh R, Greche H, El Ouali L (2014)** Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* ISSN : 2028-2508 :2319-2324
- Farley, Mcneilly T (2000)** Diversity and divergence in *Cistus salviifolius* (L.). *vol132.Issue3*. August 2000 : 183-192
- Oke F., Belma, Sahlan O, Senol A (2009)** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry* 112 : 874–879
- Al-Jabera H, Mahmoud A. Al-Qudahb, Lina M. Barhoumic., Ismail F., Abazad and Fatma U. Affid (2012)** Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried *Salvia palaestina* Benth. (Lamiaceae) growing wild in Jordan. *Natural Product Research*. Vol. 26, No. 13 : 1179–1187

Haouat A, Sqalli H, Farah A, Haggoud A, Iraqui M(2013) Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytotherapie* 11 : 365–372.

Mahmoudi H, Aouadhi C; Kaddour R, Gruber M , Zargouni H , , Zaouali W, Ben hamida N, Ben nasri M; Ouerghi Z; Hosni H(2016) Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus species* from Tunisia. *Biosci J.* 2016;32(1): : 226-237.

Sayah K, Marmouzi I, Naceiri Mrabti H, Cherrah Y, and My El Abbas F (2017) Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *BioMed Research International* Volume 2017, Article ID 2789482, 7

Kouadio N, Kone M, Guessennd N K., Konan Ke, Moussa B, Yao K., Allagba-Atsain M, Tra-bi F, Bakayoko A and Dosso M (2017). Evaluation of the antibacterial activity of leaves *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) on the in vitro growth of producing Enterobacteriaceae of beta-lactamases at extended spectrum (ESBL) strains and phytochemical screening. *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 : 431-440

Kühn C, Arapogianni N, Halabalaki M, Hempel J, Hunger N, Woher J, Skaltsounis A, Vollmer G(2011) Constituents from *Cistus salvifolius*(Cistaceae) activate peroxisome proliferator-activated receptor- γ but not - α and stimulate glucose uptake by adipocytes. *Planta Med.* 77 (4) : 346–353.

Pistelli., Reidel R, Parri F, Morelli E & Pistelli L (2018) Chemical composition of essential oil from plants of abandoned medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus Crop & Prod.* 77 : 795-802.

Verdeguera M, M. Amparo B and Herminio B (2012) Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research.* Vol. 26, No. 17 : 1602–1609

Monica Rosa Loizzo., Ben Jemia M , Senatore F , Bruno M , Menichini F, Tundis R (2013) Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 59 : 586–594

Politeoa O, Maravić A, Burčula F, Careva I and Kamenjarinb J (2018) Phytochemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Wild Growing *Cistus* species in Croatia. Vol. 13

Mastino PM, Marchetti M, Costa J & Usai M(2017) Comparison of essential oils from *Cistus* species growing in Sardinia, *Natural Product Research*, 31:3, 299-307, DOI: 10.1080/14786419.2016.1236095

Polat R and Satil F (2012) An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir—Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 2 : 626–641

Tiwari T (2008) Plants: A Rich Source of Herbal Medicine. *Journal of Natural Products*, Vol. 1:27-35

Tomas-Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalan E, Roldan-Segura C.,Segura-Carretero A, Micol V (2013) Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *J. Food. Chem. Toxicol.* 55 : 313–322.

Zrira S(1992) Les huiles essentielles d'eucalyptus du Maroc : Facteurs influençant la productivité et la qualité de ces essences. Investigations sur les possibilités d'exploiter l'Eucalyptus camaldulensis pour la production d'huile essentielle d'Eucalyptus à cinéole; Thèse de doctorat ès-sciences agronomiques ; I. A. V. Hassan II ; Rabat, Maroc

Zrira S & Benjilali B (1991) Effect of Drying on Leaf Oil Production of Moroccan *Eucalyptus camaldulensis* , *Journal of Essential Oil Research*, 3:2 : 117-118.



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).

Abstract

The genera *Cistus* present groups of about twenty species of shrubs. They belong to the family of Cistaceae, which are very common throughout the Mediterranean region.

Cistus salviifolius L, commonly called Cfeira or Melliya. It is a species of the genus *Cistus* which is found in the forest region of Mount Ouarsenis (north-west Algeria), exactly in the National Park of Theniet El Had in the Wilaya of Tissemsilt.

This study was undertaken to evaluate the antibacterial effects of the essential oil of *C. salviifolius* L. obtained by hydrodistillation (Clevenger type), and to identify its chemical composition as well as the examination of the effect of the drying time in the shade on the yield of essential oil, in order to optimize this parameter which will most often remain uncontrolled for producers.

The optimum yield recorded is about $0.07 \pm 0.02\%$, obtained during the third day of drying. The characterization of the essential oil by gas chromatography coupled with mass spectrometry, shows the existence of 39 components, dominated essentially by chemical groups belonging to oxygenated sesquiterpenes (30.76%), oxygenated monoterpenes (17.94%), hydrocarbon sesquiterpenes, esters, diterpenes which register an equivalent percentage of 12.82%.

Antibiogram performed by the agar diffusion method revealed that the antibiotics with the largest inhibition zones are Fosfomycin against *Staphylococcus aureus* (30.20mm), Kanamycin against *Bacillus subtilis* (28.50mm), Ceftazidime and Rifampicin against *Pseudomonas aeruginosa* (27.20 and 27.10 mm respectively).

The antibacterial activity of the essential oils measured *in vitro* was interesting, the diameters of inhibition zones obtained being of the order of 24.7, 23.6, 16.07, 14.74, 12.00, 9.00mm against the respective germs *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, while the respective MIC values recorded were 1/3000, 1/2000, 1/250, 1/4000, 1/250, 1/250 (v/v).

Based on the results of this study, new antibacterial agents could be developed and the use of *C. salviifolius* L should be encouraged in the pharmaceutical, and cosmetic industries.

Keywords: *Cistus salviifolius* L; essential oil; drying; yield; chemical composition; antibacterial activity

Résumé

Les genres *Cistus* présentent des groupes d'une vingtaine d'espèces d'arbustes, appartenant à la famille des Cistacées, qui sont très communs dans toute la région méditerranéenne.

Cistus salviifolius L, communément appelé Cfeira ou Melliya est une espèce du genre *Cistus* qui se trouve dans la région forestière du Mont Ouarsenis (nord-ouest de l'Algérie), exactement dans le Parc National de Theniet El Had dans la Wilaya de Tissemsilt.

Cette étude a été entreprise pour évaluer les effets antibactériens de l'huile essentielle de *C. salviifolius* L. obtenue par hydrodistillation (type Clevenger), et d'identifier sa composition chimique, ainsi que l'examen de l'effet du temps de séchage à l'ombre sur le rendement en huile essentielle afin d'optimiser ce paramètre, qui restera le plus souvent non contrôlé pour les producteurs.

Le rendement optimal enregistré est d'environ $0,07 \pm 0,02\%$, obtenu durant la troisième journée de séchage. La caractérisation de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, montre l'existence de 39 composants, dominés essentiellement par les groupements chimiques appartenant aux sesquiterpènes oxygénés (30.76%), les monoterpènes oxygénés (17.94%), les sesquiterpènes hydrocarbonés, les esters, les diterpènes qui enregistrent un pourcentage équivalent de 12.82%.

L'antibiogramme effectué par la méthode de diffusion en milieu gélosé a révélé que les antibiotiques ayant donné les plus grandes zones d'inhibition sont représentés par la Fosfomycine contre *Staphylococcus aureus* (30.20mm), la Kanamycine contre *Bacillus subtilis* (28.50mm), la Ceftazidime et Rifampicine contre *Pseudomonas aeruginosa* (27.20 et 27.10 mm respectivement).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles mesurée *in vitro* s'est montrée intéressante, les diamètres de zones d'inhibition obtenus étant de l'ordre de 24.7, 23.6, 16.07, 14.74, 12.00, 9.00 mm à l'encontre des germes respectifs *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, alors que les valeurs de CMI respectives enregistrées étant de 1/3000, 1/2000, 1/250, 1/4000, 1/250, 1/250 (v/v).

Compte tenu des résultats de cette étude, de nouveaux agents antibactériens pourraient être développés et l'utilisation de *C. salviifolius* L devrait être encouragée dans les industries pharmaceutiques et en cosmétique.

Mots-clés: *Cistus salviifolius* L ; huile essentielle ; séchage ; rendement ; composition chimique ; activité antibactérienne.