

## Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) master du Maroc sur des souches d'origine clinique

### [ Antibacterial activity of the essential oil of sawdust of root burl wood of *Tetraclinis articulata* (VAHL) master of Morocco against clinical strains ]

M. Akbli<sup>1</sup>, N. Rhallabi<sup>2</sup>, R. Ait Mhand<sup>2</sup>, M. Akssira<sup>1</sup>, and F. Mellouki<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Equipe Chimie Bioorganique et Analytique, URAC22, Laboratoire de Chimie Physique et de Chimie Bio-organique, Faculté des Sciences et Techniques, BP 146 Mohammedia (20850), Maroc

<sup>2</sup>Equipe Microbiologie Hygiène et Molécules Bioactives, Laboratoire de Virologie, Microbiologie & Qualité/Eco-toxicologie & Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques, BP 146 Mohammedia (20850), Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The increasing resistance of pathogenic bacteria to conventional antibiotics is a major public health problem. Thus the need for other alternatives in the search for new biologically active molecules is increasing. The study of the antibacterial activity of essential oils is one of the promising ways because of their antibiotic proven effectiveness on the one hand and the diversity of their biochemical composition conferring a broad spectrum of biological activities with mechanisms varied activities on the other.

This work has focused on the study of the essential oil of biological activity of sawdust burl Thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) against tested reference and clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This study aimed to the recovery of waste from the processing of Thuya burl wood in the region of Essaouira by extracting essential oil and evaluation of its biological activity against multi-resistant strains of bacteria.

The essential oil of sawdust of Thuya burl wood was obtained by steam distillation with a yield of about 1.5%. The antibacterial activity was evaluated using the aromagram method showed a high activity of the essential oil against the tested strains. This activity was 2 to 6 times greater than that obtained with the reference antibiotic. Furthermore, this essential oil was more effective on *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>) and *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>) with respectively bacteriostatic and bactericidal activities.

**KEYWORDS:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, Sawdust of root burl wood, Essential oil, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance.

**RESUME:** La résistance grandissante des bactéries pathogènes aux antibiotiques classiques pose un problème majeur de santé publique. Ainsi le besoin d'autres alternatives à la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives ne cesse d'augmenter. L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est l'une des voies prometteuses à cause de leur efficacité antibiotique avérée d'une part et de la diversité de leur composition biochimique leur conférant un large spectre d'activités biologiques avec des mécanismes d'actions variés d'autre part.

Ce travail a porté sur l'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de Thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) testée sur des souches de référence et des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Cette étude avait pour objectif la valorisation des déchets issus de la transformation du bois de loupe de Thuya dans la région d'Essaouira par l'extraction de l'huile essentielle et l'évaluation de son activité biologique sur des souches de bactéries multi résistantes.

L'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de Thuya a été obtenue par hydrodistillation avec un rendement de l'ordre de 1,5 %. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle obtenue en utilisant la méthode de l'aromatogramme ont montré que l'huile essentielle présente une activité remarquable sur les souches testées. Cette activité était 2 à 6 fois supérieure à celle obtenue en présence d'antibiotique de référence. De plus, cette huile essentielle était plus efficace sur *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>) que sur *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>) avec respectivement des activités bactériostatique et bactéricide.

**MOTS-CLEFS:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, bois de loupe, Huile essentielle, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Résistance aux antibiotiques.

## 1 INTRODUCTION

Depuis leur apparition, l'utilisation des antibiotiques pour vaincre les maladies infectieuses a constitué une véritable révolution en médecine moderne, il est cependant évident que chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances [1], [2]. La recrudescence de cette résistance aux antibiotiques représente un immense danger pour la santé mondiale et l'un des plus grands défis auxquels la santé publique est confrontée aujourd'hui. Ce phénomène est en effet très répandu notamment en milieu hospitalier où les infections nosocomiales croisées sont très fréquentes rendant ainsi les patients vulnérables et nécessitant souvent une antibiothérapie prolongée. Parmi les agents causaux impliqués dans ces pathologies, deux bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont très fréquemment rencontrés en pathologie humaine et sont au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales [3], [4].

La lutte contre ces micro-organismes multi résistants et la limitation des risques d'infections est d'une grande importance et la recherche d'autres alternatives thérapeutiques pour endiguer certaines maladies infectieuses est de plus en plus urgente.

La recherche de biomolécules d'origine végétale à action antimicrobienne fait l'objet d'un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. Parmi ces produits naturels, les huiles essentielles (HE) pourraient être une alternative particulièrement crédible puisqu'elles sont connues pour leurs activités biologiques diverses [5], [6], [7], [8], [9].

Notre étude s'insère dans le cadre des travaux de valorisation de diverses essences ligneuses menés depuis plusieurs années par notre équipe. Pour ce travail, le choix du matériel végétal s'est porté sur une espèce dont le bois est réputé pour sa résistance naturelle aux agents de dégradation et donc pour sa durabilité naturelle, il s'agit du bois de Thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, Cupressaceae).

Au Maroc, le Thuya est par excellence un arbre du bioclimat semi-aride tempéré et chaud où il occupe une superficie totale d'environ 11,7% de la surface totale couverte par la forêt marocaine. Il joue un rôle socio-économique important pour les populations riveraines en matière de parcours, bois de chauffage et bois de service divers [10]. Le Thuya est par ailleurs utilisé en médecine populaire principalement pour le traitement du diabète et de l'hypertension ainsi que le traitement des infections intestinales et respiratoires [11], [12].

Le bois de Thuya est connu aussi pour sa richesse en extractibles ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticide notamment [13], [14].

En fin, le Thuya produit des excroissances se trouvant au niveau du collet appelées loupes très appréciées pour la qualité de leur bois qui est utilisé en marqueterie et en ébénisterie. La transformation de ce bois dans les scieries peut générer jusqu'à 50% de déchets (environ 194 tonnes/mois) de la quantité consommée. Ce sous-produit de transformation du bois de Thuya, qui sert comme source d'énergie, pourrait être valorisé comme matière première pour la production des huiles essentielles.

Peu de travaux sont reportés dans la littérature concernant le bois de loupe de Thuya, parmi lesquels celui de El Moussaouiti et al. (2010) [15] a porté sur l'étude de la composition chimique et l'activité antibactérienne de l'HE d'échantillons collectés de la région d'Oulmes (Centre du Maroc), celui de Zrira et al. a étudié le rendement et la composition chimique de la sciure de bois de loupe de la région d'Aoulouz (Sud de Rabat) [16], et celui d'El Mouridi et al. (2011) [17] qui a visé la caractérisation physique de la loupe.

Notre travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de sciure du bois de loupe de Thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) master), collectée auprès des artisans de la ville d'Essaouira (sud-ouest du Maroc), vis-à-vis de souches bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* de référence et d'origine clinique.

## **2 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL**

Les échantillons de sciures du bois de loupe ont été collectés de façon aléatoire dans les ateliers de transformation de bois de Thuya à Essaouira.

### **2.2 EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE**

L'extraction de l'huile essentielle (HE) de la sciure du bois de loupe de Thuya a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger pendant 4h. La phase organique, correspondant à l'HE a été séparée de la phase aqueuse par décantation puis séchée avec du sulfate de sodium anhydre et stockée à 4°C à l'obscurité. Le rendement d'extraction de l'HE est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche.

### **2.3 SOUCHES BACTÉRIENNES**

Deux espèces bactériennes ont été utilisées pour ce travail, il s'agit de deux souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) dont une de référence (ATCC 25922) et une d'origine clinique et de deux souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), une de référence (ATCC 25923) et l'autre d'origine clinique. Ces souches, préalablement identifiées, nous ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd de Casablanca. Leur pureté a été contrôlée par isolement sur milieux gélosés spécifiques respectivement Chapman pour *S. aureus* et Mac Conkey pour *E. coli*. Elles ont été entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance et par la suite repiquées sur milieu de conservation jusqu'à leur utilisation.

### **2.4 TEST DE SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES**

La sensibilité aux antibiotiques des souches utilisées a été étudiée par la méthode classique de l'antibiogramme par diffusion sur disque et selon les recommandations du CA-SFM de 2011 [18]. Quatre antibiotiques (ATB) ont été testés: le Sulphamethoxazole Triméthoprime (SXT) (25 ug), l'Ampicilline AMP (10 ug), la Gentamicine (GM) (10 ug) et l'Erythromycine E (15 ug).

### **2.5 TEST D'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE**

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 Mac Farland ( $10^8$  UFC/mL) est préparée puis diluée à 1/100.

La détermination de la sensibilité *in vitro* des souches cliniques et de référence d'*E. coli* et de *S. aureus* vis-à-vis de l'HE de la sciure de bois de Thuya a été faite par la méthode de diffusion sur disque à l'aide d'un aromatochrome [19]. Pour cela, 5, 10 et 20 µL de l'HE et l'eau distillée (témoin négatif) ont été déposés stérilement sur des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre. Ces disques chargés en HE ont été déposés sur la surface d'une gélose Mueller Hinton (MH) préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne. Après 24h d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition (DZI) de la croissance bactérienne autour des disques ont été mesurés en mm. L'ensemble des essais ont été réalisés en triplicata. Le mode d'action bactériostatique ou bactéricide de l'HE a été déterminé selon le protocole décrit par Mayaud et al. (2008) [20].

## **3 RESULTATS ET DISCUSSION**

L'extraction de la sciure de bois de loupe de Thuya par hydrodistillation a donné une HE de couleur brune foncée à forte odeur agréable caractéristique du bois de Thuya avec un rendement d'extraction moyen de 1,5 %. Ce rendement est proche de celui obtenu par Boukhriss et al. (2010) [21] pour des échantillons de sciure de bois de tronc prélevés dans la région du centre du Maroc aux environs de Khémisset (1,63 %), il reste cependant inférieur aux rendements obtenus par Zrira et al.

(2004) [16] pour des échantillons de sciures prélevés dans la même région et aussi celui prélevé près d'Aoulouz dans la région du Sud du Maroc à partir du bois de tronc et de loupe qui étaient respectivement de 2.65%, 3.61% et 2.10%. Il est à noter néanmoins que le rendement en HE obtenu à partir de la sciure du bois est meilleur que ceux obtenus à partir des feuilles de Thuya de 0,7% et 0,3% rapportés respectivement par Barrero *et al.* (2005) [22] et Bahri *et al.* (2015) [23]. Ces résultats montrent des variations de teneurs en HE de Thuya qui peuvent s'expliquer par l'influence des facteurs liés à la nature des échantillons de bois, leur origine (effet de l'environnement : type de climat, sol...), de la méthode de préparation et d'extraction de la matière végétale et surtout à la partie de la plante utilisée ( bois du tronc, bois de loupe, feuilles ...).

L'étude de l'activité antibactérienne a été faite par la détermination du DZI de la croissance bactérienne selon la méthode de diffusion sur disques. Nous avons ainsi testé l'effet antibactérien d'antibiotiques de référence sur des souches de référence et cliniques d'*E. coli* et de *S. aureus*. Les résultats obtenus sont donnés par le Tableau 1. .

L'examen de l'antibiogramme obtenu a permis de déduire que la souche clinique d'*E. coli* était plus résistante que la souche de référence puisqu'elle était résistante à deux antibiotiques sur les trois testés. La souche *E. coli* de référence, quant à elle, a montré une résistance à l'AMP.

En ce qui concerne *S. aureus*, la souche clinique, à part sa résistance à l'AMP, était très sensible à SXT, la GM et l'E. La souche *S. aureus* de référence était en revanche sensible à tous les antibiotiques testés.

Nous avons aussi évalué l'effet antimicrobien de l'HE de la sciure du bois de loupe du Thuya sur toutes les souches bactériennes étudiées par la méthode de l'aromatogramme, le pouvoir antimicrobien de l'HE a été évalué par la mesure du DZI en mm. Les résultats obtenus ont été traités statistiquement par analyse de la variance ANOVA avec un seuil de significativité  $P < 0.05$ . L'interprétation de la sensibilité des souches bactérienne à l'HE de la sciure du bois de la loupe de Thuya a été faite selon la méthode de Szczepanski et Lipski (2014) : (DZI < 8 mm : non sensible, < 9 - 14 mm : sensible, > 15 - 19 mm : très sensible, > 20 mm : extrêmement sensible) [24].

Les résultats obtenus (Tableau 2.) ont montré que l'HE était très active sur les souches de *S. aureus* et *E. coli* aussi bien de référence que cliniques puisque les DZI déterminés étaient compris entre 12 mm et 37 mm classant ainsi la sensibilité des souches de sensibles à extrêmement sensibles. Ces résultats ont également montré que cet effet antibactérien est d'autant plus important que le volume d'HE utilisé est important (Fig.1 et 2). En effet, la souche clinique d'*E. coli* était sensible en présence de 5 uL et extrêmement sensible à partir de 10 uL, la souche ATCC était extrêmement sensible dès 5 uL d'HE.

Comparativement aux antibiotiques testés, l'effet inhibiteur de l'HE sur la croissance d'*E. coli* clinique était meilleur puisque les DZI obtenus avec 5 uL et 20 uL de l'HE étaient 2 à 5 fois supérieurs à ceux obtenus respectivement pour le SXT, l'AMP et l'E vis à vis desquels cette souche était résistante. De la même manière l'effet inhibiteur de l'HE sur la croissance d'*E. coli* ATCC était très important notamment avec 10 uL et 20 uL d'HE qui ont donné des DZI 6 fois supérieurs à ceux obtenus avec l'AMP et l'E envers les quels cette souche était résistante.

Les souches de *S. aureus* aussi bien clinique que de référence étaient extrêmement sensibles pour les trois volumes d'HE testés puisque les DZI obtenus étaient supérieurs à 20 mm. La souche clinique de *S. aureus*, résistante à l'AMP, était extrêmement sensible en présence des trois volumes d'HE de la sciure du bois de la loupe de Thuya puisque les DZI obtenus en fonction du volume de l'HE utilisé étaient 2 à 6 fois supérieur à celui obtenu en présence de l'antibiotique de référence (AMP). Il est à signaler aussi que l'effet inhibiteur de la croissance de cette souche était très important à 5 uL et était maximal dès 10 uL ce qui met en valeur l'efficacité cette HE même à des faibles quantités et limiterait sa toxicité.

**Tableau 1. Activité antibactérienne des antibiotiques de référence sur *E. coli* et *S. aureus*.**

Souches bactériennes	Antibiotiques			
	SXT	GM	AMP	E
<b>E. coli ATCC</b>	(29±0)	(20±1)	(6±0)	-
	S	S	R	-
<b>E. coli clinique</b>	(6±0)	(24±0)	(6±0)	-
	R	S	R	-
<b>S. aureus ATCC</b>	(30±1,7)	(30±0)	(26±1)	(33±0)
	S	S	S	S
<b>S. aureus clinique</b>	(30,6±1,52)	(29±0)	(6±0)	(30±0)
	S	S	R	S

**SXT** : Sulphametho Xazole Trimethoprim, **GM** : la Gentamicine, **AMP** : Ampicilline, **E** : Erythromycine, **S** : Sensible, **R** : Résistant

Tableau 2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure de bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters sur *E. coli* et *S. aureus*.

Bactérie	Diamètre d'inhibition (mm)		
	Volume HE (µL)		
	5	10	20
<i>E. coli</i> ATCC	(22,33±3,05)	(36±1)	(36±1)
	E.S	E.S	E.S
<i>E. coli</i> clinique	(12±1)	(25±2,64)	(30±2)
	S	E.S	E.S
<i>S. aureus</i> ATCC	(21±2,64)	(23±1,73)	(35,67±1,15)
	E.S	E.S	E.S
<i>S. aureus</i> clinique	(20±1)	(35,33±0,57)	(36,67±0,57)
	E.S	E.S	E.S

S : Sensible, E.S : Extrêmement sensible

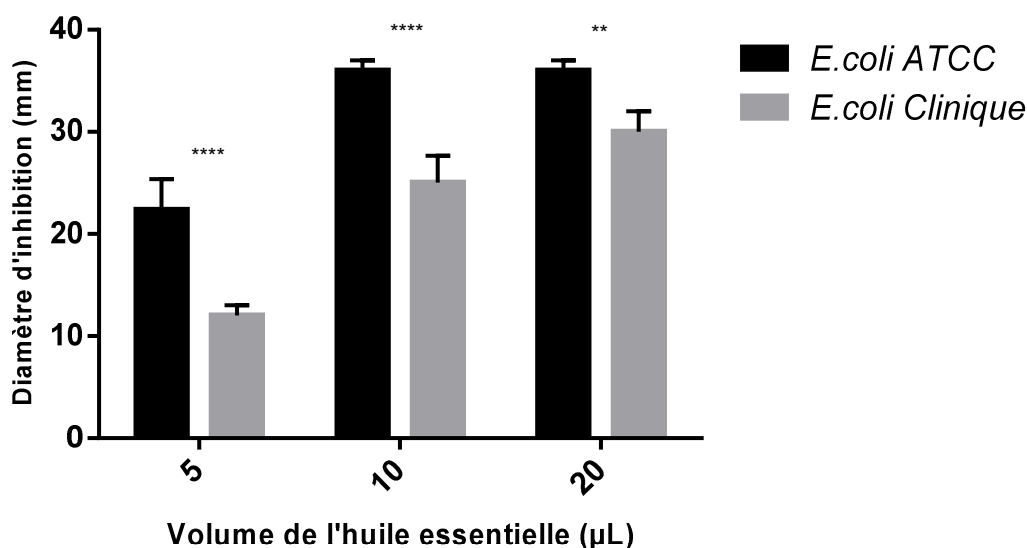
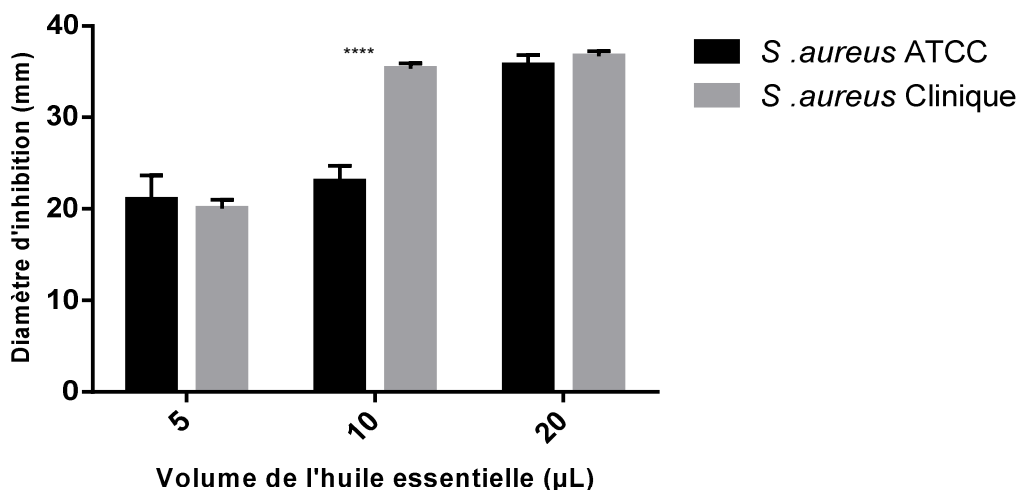


Fig. 1. Diamètres des Zones d'Inhibition (mm) de la croissance des souches d' *E. coli* clinique et ATCC en fonction du volume de l'HE de la sciure de bois de loupe de *T. articulata* (Vahl) Masters.



**Fig. 2. Diamètres des Zones d'Inhibition (mm) de la croissance des souches de *S. aureus* clinique et ATCC en fonction du volume de l'HE de la sciure de bois de loupe de *T. articulata* (vahl) Masters.**

Après avoir démontré l'effet inhibiteur de l'HE du bois de la loupe de Thuya sur la croissance des souches résistantes aux antibiotiques, l'étude de son mode d'action a été réalisé par prélèvement de disques de gélose à partir des zones d'inhibition des aromagrammes, obtenus en présence de 5 µL, 10 µL et 20 µL d'HE, et leur ensemencement dans le bouillon nutritif. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, 0,1 mL de bouillon a été utilisé pour l'ensemencement sur gélose nutritive.

Pour *S. aureus*, malgré l'absence de turbidité dans le bouillon nutritif, la présence de colonies et même de nappes révèle que la croissance de *S. aureus* a été juste inhibée par l'HE, l'effet inhibiteur de l'HE sur *S. aureus* était donc bactériostatique. En revanche aucune croissance bactérienne d'*E. coli* n'a été détectée même après plusieurs jours d'incubation. Nous en avons déduit que l'HE étudiée est dotée d'un pouvoir bactéricide puissant vis-à-vis de cette souche.

Selon ces résultats, il est clair que l'HE de la sciure du bois de loupe de Thuya a un effet antibactérien puissant sur les souches testées de *S. aureus* et *E. coli*. Cet effet est plus prononcé sur des souches cliniques résistantes à des antibiotiques de référence avec plus d'efficacité sur *S. aureus* que sur *E. coli*. Habituellement les bactéries Gram<sup>-</sup> comme *E. coli*, sont connues pour leur résistance que les bactéries Gram<sup>+</sup> comme *S. aureus* à l'effet inhibiteur des HE et ce grâce à la structure particulière de leur membrane externe [25], [26]. Ici nous avons mis en évidence un effet bactéricide puissant dès 5 µL de l'HE du bois de loupe de Thuya sur une souche clinique d'*E. coli* et seulement bactériostatique sur une souche clinique de *S. aureus*.

Plusieurs travaux antérieures ont démontré que les huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne importante due à la présence de teneurs élevées de métabolites secondaires de types terpènes alcools, aldéhydes ou phénoliques. Ces derniers, tels que le carvacrol, le thymol, sont capables de former des liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes microbiennes et peuvent ainsi contribuer aux effets antimicrobiens des HE [27], [28]. Zrira *et al.*[16] ont caractérisé la composition chimique de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* de la région de Aoulouz (Sud de Rabat) et on montré sa richesse en carvacrol (36,5-41,7%), *O*-methylhydrothymoquinone (17,4-18,1%) et  $\alpha$ -cedrene (9,1-15,6%). Boukhris *et al.*[21] ont rapporté que l'HE de la sciure du bois du tronc de *Tetraclinis articulata* de la région de Khmisset (Maroc) est caractérisée par la dominance de l' $\alpha$ -acorénol(20,9%), le cédrol (17,9%) et le totarol (8,8%) et que cette HE n'a pas montré une forte activité antibactérienne sur *E. coli* et *S. aureus* impliquées dans la contamination de denrées alimentaires.

Lors de travaux antérieurs nous avons montré que la composition chimique de l'HE du bois de *Tetraclinis articulata* de la région d'Amsa (près de Tetouan, Maroc) était riche en cedrol (30,7%), 1,7-di-epi-isocedrol (4,7%) et *p*-methoxy thymol (4,4%) [22]. Nous avons mis en évidence que l'HE de la sciure du bois de loupe du *Tetraclinis Articulata* (Vahl) Masters de la région d'Essaouira, est constitué majoritairement de composés phénolique suivis de dérivés de cerdol représentant environ 83% de la totalité des 31 composés identifiés de cette HE qui présentait des activités antifongiques et insecticides très prononcées [13]. Ces activités ainsi que l'activité antibactérienne sur des souches cliniques résistantes aux antibiotiques que nous avons mise en évidence ici, augurent dans le sens de l'importance des constituants terpéniques notamment les dérivés du carvacrol et ceux du cedrol dans l'activité biologique de cette HE. Ce résultat est conforté par les données de la littérature montrant l'efficacité biologique des HE riches en carvacrol et en thymol dont l'efficacité antimicrobienne est expliquée par la position

du groupement hydroxyle sur la structure phénolique de ces molécules [29], [30], [31], [32] et qui agiraient en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires des bactéries provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires [33].

#### 4 CONCLUSION

Notre travail a été consacré à l'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de Thuya sur des souches bactérienne clinique et de référence. Cette étude nous a permis de montrer qu'à partir de ce déchet de transformation du bois nous avons pu obtenir une HE avec des rendements très intéressants dépassant 1% et que cette HE présente une qualité chimique lui permettant d'être dotée d'un pouvoir antibactérien puissant *in vitro* vis-à-vis des souches bactériennes cliniques résistantes aux antibiotiques. Ce pouvoir inhibiteur élevé pourrait s'expliquer par la richesse de cette HE en phénols terpéniques. L'efficacité antibactérienne mise en évidence par ce travail, nécessite l'approfondissement de ces recherches afin de valoriser ce déchet de bois dans le domaine de la recherche des molécules bioactives.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par des subventions de l'Université Hassan II-Mohammedia-Casablanca et du Ministère De L'Enseignement Supérieur, De La Recherche Scientifique Et De La Formation Des Cadres. Nous remercions chaleureusement le Prof Pr Khalid ZEROUALI du CHU Ibn Rochd- Casablanca pour le fourniture des souches de référence et clinique.

#### REFERENCES

- [1] GC. Kirby, "Medicinal plants and the control of parasites", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 90, pp.605-609, 1996.
- [2] K. Hostettmann and A. Marston, "Twenty Years of Research into Medicinal Plants/ Results and Perspectives", *Phytochemistry, Rev.1*, pp.275-285, 2002.
- [3] V. Hancock, L. Ferrières, P. Klemm, "Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains", *FEMS Microbial Letters*, vol. 267, no. 1, pp.30-37, 2007.
- [4] TC. Horan, M. Andrus, MA. Dudeck, "CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting", *American Journal of Infection Control*, vol. 36, no. 5, pp.309-32, 2008.
- [5] S. Lamassiaude-Peyramaure, "Nouvelles thérapeutiques à l'officine Homéopathie et aromathérapie. Actualités pharmaceutiques", *Actualités Pharmaceutiques*, vol. 47, no. 475, pp. 27-28, 2008.
- [6] C. Demetzos, D. Perdetzoglou, M. Gazouli, K. Tan, C. Economakis, "Chemical Analysis and Antimicrobial Studies on Three Species of *Ferulago* from Greece", *Planta Medica*, vol. 66, pp.560-563, 2000.
- [7] N.B. Takaisi-Kikuni, D. Tshilanda, B. Babady, "Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*", *Fitoterapia*, vol. 71, pp.69-71, 2000.
- [8] O. Tzakou, D. Pitarokili, IB. Chinou, C. Harvala, "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*", *Planta Medica*, vol. 67, no. 1, pp.81-83, 2000.
- [9] S. Karaman, M. Digrak, U.A. Ravid, A. Ilcim, "Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey.", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, pp.183-186, 2001.
- [10] O. Mhirit, F. Benchekroun, "Les écosystèmes forestiers et péri forestiers : situation, enjeux et perspectives pour 2025", Contribution au Rapport sur le Développement Humain (RDH50) Maroc, GT8-7, pp.397-483, 2006.
- [11] J. Bellakhdar, *La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*, Ibis press 759, 1997.
- [12] A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni, W. Benjelloun, "Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco.", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 58, no. 1, pp.45-54, 1997.
- [13] F. El Hanbali, N. Amusant, F. Mellouki, M. Aksira, C. Baudasse, Potentiality of use extracts from *Tetraclinis articulata* like biocide against wood destroying organisms: *Reticulitermes santonensis*. Proceeding of International Research Group on Wood Protection, 20-24 May, Jackson, USA, Doc. IRG/WP 07-30418, p. 14, 2007.
- [14] B. AOUINTY, S. OUFARA, F. MELLOUKI, S. MAHARI, "Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre

- moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen) ", Base [En ligne], vol. 10, no. 2, pp.67-71, 2006.
- [15] M. El Moussaouiti, A. Talbaoui, A., S. Gmouh, M. Aberchane, A. Benjouad, Y. Bakri, D, P. Kamdem, "Chemical composition and bactericidal evaluation of essential oil of *Tetraclinis articulata* burl wood from Morocco", *Journal Indian Academy of Wood Science*, vol. 7, no. 1-2, pp.14-18, 2010.
- [16] S. Zrira, B. Benjilali, J.M.Bessiere, C.Menut, A. Elmrani, "Yield and chemical Composition of the Sawdust essential oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* (Vahl) ", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 7, no. 3, pp.217-222,2004.
- [17] M. El Mouridi, T. Laurent , A. Famiri , B. Kabouchi , T. Alméras , G. Calchéra , A. El Abid , M. Ziani , J. Gril , A. Hakam, "Physical characterization of the root burl wood of thuja (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) ", *Physical and Chemical News*, vol. 59 ,pp.57-64, 2011.
- [18] CA-SFM, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2011, 2011.
- [19] F. EL. Hanbali, M. Akssira, A. Ezoubeiri, Chems eddoha A. Gadhi, Fouad Mellouki, Ahmed Benherraaf, Amparo M. Blazquez, Herminio Boira. "Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. ", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, pp.399-401, 2005.
- [20] Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol*, vol. 47, no. 3, pp.167-73.
- [21] M. Bourkhiss, M. Hnach, T. Lakhli, B. Bourkhiss, M. Ouhssine, B. Satrani. "Production and characterization of the sawdust of wood essential oil of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters", *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 79, pp.4- 11, 2010.
- [22] A.F. Barrero, M.M. Herrador, P. Arteaga, J. Quílez M. Akssira, F. Mellouki and S. Akkad, "Chemical Composition of the Essential Oils of Leaves and Wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters", *Journal of Essential Oil Research*, vol. 17, pp.166-168, 2005.
- [23] F. Bahri, A. Romane, M. Höferl, J. Wanner, E. Schmidt & L. Jirovetz, "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters", *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 28, no. 1, pp.42-48, 2015.
- [24] S. Szczepanski, A. Lipski, "Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation". *Food Control*, vol. 36, no. 1, pp.224-229, 2014.
- [25] G. De Billerbeck, Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse (236), 2000.
- [26] S. Cosentino, C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, F. Palmas, " *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 29, no. 2, pp.130-135, 1999.
- [27] G. Picone, L. Laghi, F. Gardini, R. Lanciotti, L. Siroli, F. Capozzi, "Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using 1H-NMR spectroscopy", *Food Chemistry*, vol. 141, pp.4367-4374, 2013.
- [28] J. Ivanovic, D. Misic, I. Zizovic, M. Ristic, " *In vitro* control of multiplication of some food associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates", *Food Control*, vol. 25, pp. 110-116, 2012.
- [29] M. Sökmen, J. Serkedjieva, D. Daferera, M. Gulluce, M. Polissiou, B. Tepe, H.A. Akpulat, F. Sahin, A. Sokmen, "In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp.3309-3312, 2004.
- [30] S. Felice, N. Francesco, A.A. Nelly, B. Maurezio , H. Werner, "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L ", *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 20, no. 3, pp.291-294, 2004.
- [31] F.P.K. Jesus, L. Ferreira, K.S. Bizzi, É.S. Loreto, M.B. Pilotto, A. Ludwig, S.H. Alves, R.A. Zanette. J.M. Santurio, " *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*", *Journal of Médical Mycology*, vol. 25, pp.89-93, 2015.
- [32] Q. Zhang , K. Fan, P. Wang , J. Yu , R. Liu , H. Qi, H. Sun, Y. Cao, "Carvacrol induces the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia", *European Journal of Pharmacology*, vol. 770, pp.134-146, 2015.
- [33] M. LAHLOU, "Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils", *Phytotherapy Research*, vol. 18, pp.435-448, 2004.