

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOÛT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de
Master

Filière : Sciences Biologiques

Option: Microbiologie

Appliquée

Intitulé

Effet de *Rosmarinus officinalis* L. sur les micro-organismes multirésistants (اكليل الجبل)

Présenté Par : Mallem Nessrine, Laloui Bisma, Lahoues

Safa, Gherib Hadil

Membres de Jury:

Dr Boucetta S .	MCA	Président	Université 20 août 1955- Skikda
Dr Aggoun A .	MCB	Directeur de mémoire	Université 20 août 1955- Skikda
Dr Becheker I .	MCA	Examinatrice	Université 20 août 1955- Skikda

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

*Louange à Dieu, le Tout-Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce travail dans le cadre du mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du **diplôme de Master** à la **Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie** – Université du 20 Août 1955, Skikda.*

*Nous exprimons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante, **Madame la Docteure Aggoun Asma**, pour sa précieuse supervision, ses conseils scientifiques avisés, sa patience et sa disponibilité tout au long de ce travail. Son accompagnement a été un pilier essentiel dans la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont également à la **coopérative Green Hill**, pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité, et les moyens mis à notre disposition lors de la phase pratique de notre étude.*

*Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel du **Laboratoire de la Santé de la Wilaya de Skikda**, ainsi que tous les enseignants et les agents administratifs de l'Université du 20 Août 1955 – Skikda, pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de notre parcours.*

*Enfin, nous adressons notre profonde gratitude à **nos familles** respectives, pour leur soutien moral, leurs sacrifices, et leur présence constante, sans lesquels nous n'aurions pas pu atteindre ce niveau.*

Puisse ce travail être le point de départ d'une carrière scientifique et professionnelle fructueuse, et que Dieu nous accorde le succès dans la suite de notre parcours.

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail.

Nous remercions sincèrement Dr. Aggoun, notre encadrante, pour son accompagnement, ses conseils précieux, sa disponibilité et son encadrement tout au long de cette étude.

Nos remerciements vont également à Dr. Boucetta S. et Dr. Becheke I. pour avoir accepté de faire partie du jury, pour le temps qu'ils nous ont accordé ainsi que pour leurs remarques constructives qui ne peuvent que contribuer à l'amélioration de ce travail.

DÉDICACE

*A ma très **chère mère** Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très **cher père** Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mes très **chers frères** Shirine , Issam et Roza*

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

Gherib Hadil

DÉDICACE

Louange à Dieu, par Sa grâce les bonnes choses s'accomplissent.

*À ma chère mère, source d'amour et de prières,
Et à mon père bien-aimé, mon pilier et mon repère,
Je vous adresse toute ma gratitude et mon affection.*

*À mes frères et sœurs adorés : Saja, Youssef, Charaf et Koussay,
Votre présence m'a toujours apporté force et réconfort. Que Dieu vous garde..*

Ce mémoire vous est dédié, avec tout mon cœur .

À mon fiancé, merci pour ton soutien, ta patience et ta présence rassurante tout au long de ce parcours.

Laloui Besma

DÉDICACE

Louange à Dieu, par Sa grâce ce travail a pu voir le jour.

À ma chère mère,

Ton amour, ton soutien et tes prières ont été la lumière de mon chemin. Merci pour tout.

À mon père adoré,

Ton courage et ta présence à mes côtés m'ont toujours donné la force d'avancer.

À mes chers frères et sœur : Yousra, Khalil et Abdo,

Merci d'être toujours là, avec amour et bienveillance. Que Dieu vous protège.

Ce mémoire vous est dédié, avec tout mon cœur.

Lahoues Safa

DÉDICACE

Louange à Dieu, par Sa grâce ce travail a pu voir le jour.

À mon père adoré, qui vit loin de nous, affrontant les sacrifices de l'éloignement pour nous offrir un avenir meilleur. Ta patience, ta force et ton amour silencieux m'ont toujours inspirée. Merci infiniment, papa.

À ma chère mère, ton amour inconditionnel, ton soutien de chaque instant et tes prières sincères ont illuminé mon chemin. Merci pour ta tendresse et ta force.

*À mes frères et ma sœur bien-aimés : **Amine , anis , raghad et idriss** merci pour votre affection, votre soutien constant et votre présence rassurante. Que Dieu vous protège et vous comble de bonheur.*

Ce mémoire vous est dédié, avec tout mon amour et toute ma reconnaissance.

Mallem Nessrine

Table des matières:

<u>Introduction</u>	1
<u>Chapitre I: <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</u>	
<u>I- 1 /Classification botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	2
<u>I- 2 /Description morphologique :</u>	2
<u>1.Appareil végétatif :</u>	3
<u>2.Appareil reproducteur :</u>	3
<u>I-3 /Répartition géographique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L:</u>	3
<u>I-4 /Constituants chimiques principaux de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	4
<u>A / Huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> L :</u>	4
<u>B / Composés phénoliques :</u>	5
<u>C / Diterpènes :</u>	5
<u>D / Flavonoïdes :</u>	5
<u>I-5/ Usages thérapeutiques traditionnels et modernes de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	5
<u>5-1 Usages traditionnels :</u>	5
<u>5-2 Usages modernes :</u>	5
<u>Chapitre II : Généralités sur les souches microbiennes ciblées</u>	
<u>Généralités sur les souches microbiennes ciblées</u>	7
<u>II 1/ Présentation des souches testées</u>	7
<u>1 . 1 Les souches cliniques :</u>	7
<u>1. 2 Les souches de références :</u>	8
<u>Chapitre III : L'activité antimicrobienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</u>	
<u>III 1/ Définition des plantes médicinales :</u>	12
<u>III 2/ Les composés bioactifs et mode d'action de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	12
<u>III 3/ Résistance bactérienne :</u>	12
<u>III 4/ Mécanismes d'action antimicrobienne :</u>	13
<u>Chapitre IV : Matériel et Méthodes :</u>	
<u>IV 1 / Cadre de l'étude :</u>	14
<u>IV 2 / Matériels utilisés :</u>	14
<u>2- 1 Matériel non biologique :</u>	14
<u>2-2 Matériel biologique :</u>	15
<u>2-2 -1 Matériel végétal :</u>	15
<u>A/ Récolte :</u>	15
<u>B -Séchage</u>	15

<u>IV 3 / Les souches testées :</u>	15
<u>IV 4/ Conservation des souches :</u>	16
<u>IV 5 / Méthodes :</u>	17
<u>5-1 / Préparation de l'extrait hydro-éthanolique et hydro-méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	18
<u>5-2 Protocole d'extraction des huiles essentielles :</u>	18
<u>5-3 Calcul du rendement :</u>	19
<u>5-4 Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme :</u>	19
<u>A/ Revivification des souches microbiennes :</u>	19
<u>B/ Repiquage des souches microbiennes :</u>	19
<u>C / Observation microscopique :</u>	20
<u>D/ Coloration de Gram :</u>	21
<u>E/ Étapes de la méthode :</u>	21
<u>IV 6 / Méthode de l'aromatogramme :</u>	21
<u>6-1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'He de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</u>	22
<u>6-2 Standardisation selon McFarland :</u>	22
<u>6-3 Ensemencement :</u>	23
<u>6-4 Application des disques :</u>	23
<u>6-5 Incubation :</u>	24
<u>IV - 7 / Activité antimicrobienne par la méthode des puits :</u>	24
<u>7-1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydroéthanolique et de l'extrait hydromethanlique <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	24
<u>7.1.1 Préparation des dilutions :</u>	24
<u>A/ Préparation des dilutions avec 9g/100ml (Éthanol 72 + Eau distillée 18) :</u>	24
<u>B/ Préparation des dilutions à partir d'une solution mère (50% méthanol et 50% eau distillée.).....</u>	25
<u>7-1-2 Standardisation selon McFarland :</u>	26
<u>7-1-3 Ensemencement :</u>	26
<u>7-1-4 Méthode des puits :</u>	26
<u>IV 8 /Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :</u>	27
<u>8-2 Détermination de la CMI :</u>	27
<u>8-3 Détermination de la CMB :</u>	27
<u>Chapitre V : Résultats et Discussion</u>	
<u>V-1 /Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L :</u>	29
<u>V/ 2 -les Extraits hydro-éthanoliques et hydro- méthanolique :</u>	30
<u>2-1 Extrait hydroéthanolique.....</u>	30

<u>2-2 Extrait hydro-méthanolique</u>	30
<u>Le rendement d'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L de cette étude est 6%</u>	31
<u>V / 3-Identifications des souches microbiennes</u>	31
<u>V / 4-L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L</u>	32
<u>V / 5-L'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique</u>	34
<u>V / 6-L'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique :</u>	38
<u>V / 7-Résultats de la CMI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ;</u>	41
<u>V / 8-Résultats de la CMB de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 :</u>	43
<u>Conclusion</u>	43

Liste des tableaux

Tableau .1 Classification botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	2
Tableau 02: Matériel non biologique	14
Tableau 03 : Les paramètres géographiques de la région de récolte de <i>Rosmarinus officinalis</i> L....	15
Tableau 04: Les souches microbiennes testées	16
Tableau 05 : dilution d'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	22
Tableau 06 : dilutions de l'extrait hydroéthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	25
B/ Préparation des dilutions à partir d'une solution mère (50% méthanol et 50% eau distillée.).....	25
Tableau 07 : Dilutions de l'extrait hydrométhanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	26
Tableau 08 : Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	29
Tableau 09 : caractéristique les Extraits hydro- éthanoliques ethydro- méthanolique	30
Tableau 10 : rendement de l'extrait éthanol de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	30
Tableau 11 : rendement de l'extrait méthanol de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	30
Tableau12 : Observation macroscopique et microscopique les souches (photo personnelle)	31
Tableau13: Les diamètres des zones d'inhibitions de HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	33
Tableau14 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-méthanolique.....	36
Tableau15 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique.....	39
Tableau 16 : Les résultats de CMI de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	41
Tableau17 : Les résultats de CMB de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	42

Liste des figures

Figure 10 : Etapes d'ensemencement sur Mueller Hinton par écouvillonnage.....	23
Figure 11 : Dépôt des disques imprégnés de solution sur la gélose ensemencée(photo personnelle)	24
B/ Préparation des dilutions à partir d'une solution mère (50% méthanol et 50% eau distillée.).....	25
Figure 12 : Comparaison entre la suspension bactérienne et le contrôle positif (prise personnelle)	27
Figure13 : L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	32
Figure 14 : Zones d'inhibitions induites par l'extrait hydrométhanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L contre différentes souches microbiennes (dilutions 01,02,03,04,05)	35
Figure 15 : Zones d'inhibition formées par les quatre dilutions de l'extrait hydro-éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L contre différentes souches microbiennes	39
Figure 16 : Comparaison entre les résultats de CMI de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L et le contrôle positif.....	40
Figure 17 : les résultats de CMB de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	42

Liste des Abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSG : Diméthyl sulfoxyde de glycérine

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

HE : Huile Essentielle

L. : Linnaeus

NCIMB : National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria

RAM : Résistance aux Antimicrobiens

Introduction

La résistance antimicrobienne représente aujourd'hui l'un des défis majeurs en matière de santé publique à l'échelle mondiale. Cette situation s'est aggravée avec l'usage excessif et parfois inapproprié des antibiotiques, menant à l'émergence de souches microbiennes multirésistantes et réduisant considérablement l'efficacité des traitements classiques. Dans ce contexte, la recherche d'alternatives naturelles et sûres devient une nécessité urgente (**Hamdani, 2017**) .

Les plantes médicinales sont des végétaux utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques naturelles, notamment leurs capacités à inhiber la croissance de micro-organismes pathogènes (**Lešnik et al., 2021**) . *Rosmarinus officinalis* L. communément appelé romarin, est une plante médicinale dont les extraits, en particulier l'huile essentielle, possèdent des activités antimicrobiennes significatives contre divers agents infectieux, incluant des bactéries Gram-positives comme *Staphylococcus aureus* et Gram-négatives telles que *Escherichia coli*, ainsi que des champignons comme *Candida albicans* (**Jeevalatha et al., 2022**). *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) se distingue par sa richesse en composés actifs tels que le *1,8-cinéole*, le *camphre* et l'acide rosmarinique, qui lui confèrent des propriétés antimicrobiennes remarquables (**Hamdani, 2017**) .

L'hypothèse de cette étude repose sur le fait que *Rosmarinus officinalis* L. présente une activité antimicrobienne de son huile essentielle et de ses extraits hydro-éthanolique et hydro-méthanolique.

Dans cette optique, le présent travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* contre différentes souches bactériennes et fongiques. Ce travail est composé de deux parties : l'étude de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et celle des extraits hydrométhanolique et hydroéthanolique, afin de comparer leur efficacité respective dans la lutte contre les microorganismes .

Chapitre I:

Rosmarinus officinalis L.

- 1 /Classification botanique de *Rosmarinus officinalis* L :

Le tableau 01 représente la classification botanique de *Rosmarinus officinalis* L (Mostefaï, 2012) :

Tableau_1 Classification botanique de *Rosmarinus officinalis* L (Mostefaï,2012) .

	Nom
Règne	<i>Plantae (Plantes)</i>
Sous-règne	<i>Cormophytes (Plantes à tige)</i>
Division	<i>Spermatophyta (Plantes à graines)</i>
Sous-division	<i>Angiospermes (Plantes à fleurs)</i>
Classe	<i>Eudicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae (Labiées)</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L

I- 2 /Description morphologique :

Rosmarinus officinalis L. est une plante aromatique de la famille des Lamiaceae, elle est également cultivée en Asie centrale, en Inde, appelé romarin. La plante est un buisson qui atteint de 0,50 à 1,50 m de hauteur en Asie du Sud-est, en Afrique du Sud, en Australie, aux États-Unis et au Brésil. Aujourd'hui, il est cultivé dans de nombreuses régions du monde et est communément, avec des feuilles à l'arôme très piquant et des fleurs bleues, violettes et blanches (Rodriguez Salazar et al., 2019) .

1.Appareil végétatif :

- **Racine** : est profonde et pivotante
- **Tige** : est quadrangulaire (souvent renflée aux nœuds), recouverte d'une cuticule

relativement épaisse, assez imperméable à l'eau et aux gaz permettant de limiter la perte d'eau via la transpiration.

• **Feuilles**: sont fines , coriaces, simples la plupart du temps, et presque toujours opposées décussées, L'épiderme inférieur des feuilles est muni de stomates localisés dans des creux et cryptes protégés par de nombreux poils técteurs pluricellulaires ramifiés à limbe enroulé par-dessous. (**Leplat, 2017**) .

2.Appareil reproducteur :

• **Inflorescences** : sont de type cyme bipares puis unipares et sont situées à l'aisselle des feuilles supérieures. Elles sont le plus fréquemment condensées en glomérules et simulent souvent un verticille de fleurs autour de la tige.

• **Fleur** : possède un plan de symétrie vertical car la corolle est zygomorphe et l'étamine supérieure est absente. Elle est le plus souvent hermaphrodite :

- ❖ Le calice est plus ou moins bilabié persistant est parfois accrescent autour du fruit.
- ❖ La corolle bilabiée, longuement tubuleuse, parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre inférieure trilobée, la supérieure est bilobée.
- ❖ L'androcée est didyname formé de 4 étamines, la cinquième étant très réduite, parfois 2 étamines et 2 staminodes.
- ❖ Le Gynécée forme 2 carpelles biovulés subdivisés chacun par une fausse cloison en 2 logettes uniovulées

• **Fruit** : constitué par 3 akènes plus ou moins soudées par leur face interne. La graine est exalbuminée. (**Leplat, 2017**) .

-3 /Répartition géographique de *Rosmarinus officinalis* L:

Etant donné qu'il est cultivé depuis l'antiquité, on le retrouve dans de nombreux pays (Figure 01) d'Europe et d'Asie notamment l'Inde et les Philippines, l'Australie, les Etats-Unis, le Mexique, l'Afrique du nord et au sud de l'Espagne où il est considéré comme endémique (**Josée et Minero, 2020**) .

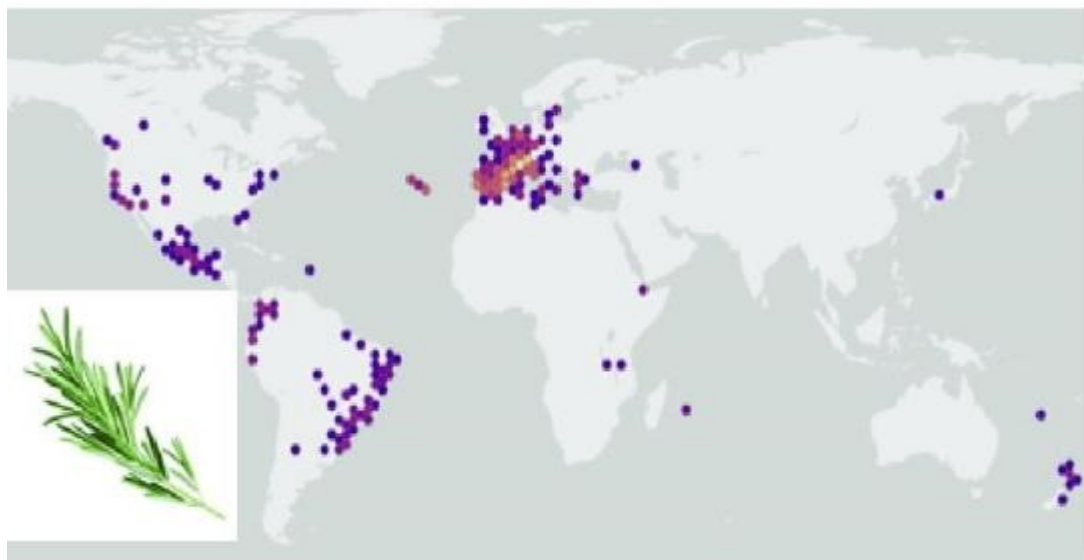


Figure 1 :Répartition géographique de *Rosmarinus officinalis* L (Josée et Minero, 2020) .

Rosmarinus officinalis L est considéré comme originaire des régions méditerranéennes comme le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, la France, l'Espagne, le Portugal, la Grèce, la Turquie et l'Italie (Borges et al., 2019) . En Algérie, le Romarin fait partie des espèces végétales qui se présentent à l'état sauvage dans les zones littorales pas très loin de la mer, les lieux secs et arides même au Sahara (Helal, 2010) . Aujourd'hui, il est répandu un peu partout dans les climats tempérés qui connaissent des hivers doux (Bousbia, 2011) .

-4 /Constituants chimiques principaux de *Rosmarinus officinalis* L :

Rosmarinus officinalis L (romarin) contient une grande diversité de **composés bioactifs** appartenant aux classes suivantes :

A / Huiles essentielles de *R. officinalis* L :

- Est composé de :

- *1,8-cinéole (eucalyptol)* 28.6-52.2 %
- *Camphre* 5.3 – 16.8 %
- *α-pinène* 9.9 – 19.3 %
- *β-pinène* 2.2 – 8.0 %
- *Bornéol* 1.0 – 3.0 %
- *linalol* 1.0 > %

➤ Propriétés : **Antiseptique** : Nettoie et tue les microbes sur la peau .

Antimicrobien : Stoppe ou tue les microbes dans tout le corps.

Expectorant : Aide à faire sortir le mucus des poumons (**Pájaro-González et al., 2023**) .

B / Composés phénoliques :

- Acide rosmarinique 0.10 – 0.12 %
- Acide caféique 0.01 – 0.05 %
- Acide férulique <0.01 %

➤ Propriétés : antioxydant, anti-inflammatoire (**Bozin et al., 2007**) .

C / Diterpènes :

- Acide carnosique 1.5 – 2.5 %
- Carnosol 0.2 – 0.3 %

➤ Propriétés : puissant antioxydant, activité anticancéreuse potentielle (**Borrás-Linares et al., 2014**) .

D / Flavonoïdes :

- Lutéoline<0.1 %
- apigénine<0.1 %
- hespéridine<0.1 %

➤ Propriétés : antioxydant, anti-inflammatoire (**Ibarra et al., 2010**) .

5/ Usages thérapeutiques traditionnels et modernes de *Rosmarinus officinalis* L :

Rosmarinus officinalis L., plus connu sous le nom de romarin, est une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiaceae, largement utilisée en phytothérapie traditionnelle et moderne (**Al-Sereiti et al., 1999**) .

5-1 Usages traditionnels :

Le romarin a un usage médicinal depuis l'Antiquité pour traiter les troubles digestifs, tels que les ballonnements, les dyspepsies et les coliques (**Al-Sereiti et al., 1999**) .

Il est un stimulant hépatique et cholérétique (**Al-Sereiti et al., 1999**) favorisant la sécrétion biliaire. En usage externe, des décoctions ou huiles infusées de romarin sont appliquées en compresses pour soulager les douleurs, rhumatismales et musculaires (**Ibarra et al., 2010**) .

Dans certaines cultures méditerranéennes, il est employé en fumigation en vue de purifier l'air, et ses feuilles sont considérées comme facilitant la mémoire et la concentration (**Al-Sereiti et al., 1999**) .

5-2 Usages modernes :

Les études récentes ont révélé les multiples propriétés pharmacologiques du romarin, qui présentent une forte activité antioxydante liée à des polyphénols tels que l'acide rosmarinique, le carnosol et l'acide carnosique **(Borrás-Linares et al., 2014)**.

Ces molécules permettent de lutter contre les radicaux libres et contribuent à la prévention des maladies cardiovasculaires, cognitives et du cancer **(Babaei et al., 2020)**.

Les radicaux libres sont des molécules très réactives qui, en excès, peuvent endommager les cellules et favoriser le vieillissement et certaines maladies. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des dérivés instables de l'oxygène, produits naturellement dans les cellules, qui peuvent causer des dommages biologiques lorsqu'ils sont en excès **(Vázquez-Roncero et al., 2021)**.

Le romarin présente également des propriétés anti-inflammatoires, notamment par l'inhibition des médiateurs de l'inflammation, dont certaines prostaglandines **(Babaei et al., 2020)**.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté les effets antimicrobiens du romarin contre certaines souches de bactéries Gram+ et Gram- **(Borrás-Linares et al., 2014)**.

Les extraits de romarin ont également montré un effet neuroprotecteur, en améliorant des performances cognitives et la mémoire, amenant à envisager un potentiel contre les maladies neurodégénératives telles que celle d'Alzheimer **(Babaei et al., 2020)**. Il est aussi rapporté que des études montrent un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique avec une réduction des taux de cholestérol et des triglycérides dans des modèles expérimentaux animaux **(Ibarra, 2010)**.

6/ Définition des plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont des végétaux utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques, souvent en phytothérapie, médecine traditionnelle ou comme sources de composés bioactifs pour la pharmacopée et l'industrie agroalimentaire (Sofowora, 2010) .

Elles contiennent des métabolites secondaires (comme les flavonoïdes, tanins, alcaloïdes) qui confèrent des effets bénéfiques sur la santé, notamment des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et antispasmodiques(Sofowora, 2010) .

7/ Les composés bioactifs et mode d'action de *Rosmarinus officinalis L* :

Rosmarinus officinalis L. est une plante médicinale riche en composés bioactifs qui lui confèrent une large gamme d'activités biologiques (Akshay et al., 2019) . notamment antimicrobiennes. Les principaux constituants responsables de ces effets sont les huiles essentielles, dont les composants majeurs sont le 1,8-cinéole, le camphre, l' α -pinène et l'acétate de bornyle, ainsi que des diterpènes phénoliques comme le carnosol et l'acide carnosique.(Hamidpour et al., 2017) .

En complément, le screening phytochimique réalisé dans l'étude de (Makhloufi, 2013) . a mis en évidence la présence de flavonoïdes (flavones) . tanins galliques, anthocyanes, leucoanthocyanes, saponosides et composés réducteurs (Gonzalez-Trujano et al., 2007) .

Enfin, la richesse chimique de *Rosmarinus officinalis L.*, notamment en acide rosmarinique (Harrane, 2012) .en rosmarinine ainsi qu'en d'autres dérivés phénoliques tels que la rosmariquinone et le rosmaridiphénol, contribue à renforcer ses propriétés antimicrobiennes. Cette activité se manifeste par un effet antibactérien à la fois contre les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ainsi qu'une activité antifongique contre *Candida albicans* (Moreno et al., 2006 ; Ghedira, 2005) .

8/ Résistance bactérienne :

Causes de la résistance bactérienne :

La résistance bactérienne est principalement due à plusieurs facteurs, notamment :

L'usage excessif et inapproprié des antibiotiques, qui favorise la sélection de souches résistantes.

capacité des bactéries à former des biofilms, des communautés microbiennes protégées qui rendent les bactéries moins sensibles aux traitements antimicrobiens.

Les mutations génétiques et le transfert horizontal de gènes de résistance entre bactéries.

□ Les infections opportunistes par des levures comme *Candida* spp. qui peuvent aussi développer une résistance aux antifongiques classiques (González-Vallinas et al., 2015) .

I/ Mécanismes d'action antimicrobienne :

Ces composés agissent en inhibant la croissance microbienne par divers mécanismes, notamment l'inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des lipides, ainsi que par une action directe sur la membrane cellulaire bactérienne à travers la modification de sa perméabilité et la désorganisation de sa structure.

Cela entraîne une perte de l'équilibre ionique et du contenu intracellulaire, ce qui conduit à la mort cellulaire (Akshay et al., 2019) .

Par ailleurs, il a été démontré que les huiles essentielles extraites de *Rosmarinus officinalis L* peuvent inhiber l'adhésion des cellules fongiques, telles que *Candida albicans*, en altérant la structure cellulaire et en augmentant la perméabilité membranaire.

Ce qui limite la formation de biofilms connus pour leur forte résistance, renforçant ainsi l'efficacité antifongique de ces huiles. (Hamidpour et al., 2017) .

D'autre part, des composés tels que les flavonoïdes et les tanins contribuent à l'activité antimicrobienne en stabilisant les protéines et en formant des complexes insolubles qui interagissent avec la paroi cellulaire bactérienne (Gonzalez-Trujano et al., 2007) (Daira et al., 2016) .

Chapitre II :

**Généralités sur les souches
microbiennes ciblées**

1/ Présentation des souches testées

- **1 . 1 Les souches cliniques :**

- **Souches microbiennes Gram positives :**

- *Staphylococcus aureus* :

Bactérie pathogène fréquente, responsable notamment d'infections cutanées, respiratoires et systémiques (sont des bactéries qui se propagent par le sang et infectent plusieurs organes du corps, pas seulement le point d'entrée.) elle est couramment testée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de romarin dans de nombreux travaux universitaires , Famille : *Staphylococcaceae*

- Habitat : *Staphylococcus aureus* se trouve naturellement sur la peau et dans les muqueuses humaines, notamment dans le nez, la gorge, et parfois dans le système digestif. Environ 20 à 30 % des personnes en sont porteurs sans présenter de symptômes. Elle peut devenir pathogène en cas de blessure, d'immunodépression ou d'intervention médicale invasive. (Benyahia 2019 Universide Blida) .

- **Souches microbiennes Gram négatives :**

- *Escherichia coli* :

Une bactérie intestinale modèle souvent à l'origine d'infections urinaires et des gastro-entérites, régulièrement testées dans le cadre de l'activité antibactérienne au sein de nombreuses recherches , Famille : *Enterobacteriaceae*

- Habitat : *E. coli* se trouve naturellement dans le tube digestif des humains et des animaux à sang chaud. Elle constitue une flore intestinale normale, mais certaines souches peuvent devenir pathogènes et provoquer des infections. (Benyahia,al 2019) .

- *Klebsiella pneumoniae* :

Pathogène opportuniste impliqué dans des infections respiratoires et nosocomiales, elle est étudiée dans plusieurs mémoires portant sur les extraits de romarin , Famille : *Enterobacteriaceae*

- Habitat : *K. pneumoniae* fait partie de la flore intestinale et nasopharyngée normale des humains et des animaux à sang chaud, mais se rencontre aussi dans les eaux usées, les sols pollués, les eaux de surface et les (Amirouche, Benlamari&Boulebgal, 2023) .

- *Pseudomonas aeruginosa* :

Une bactérie de grande résistance aux antibiotiques, largement utilisée pour estimer la résistance microbienne au sein de l'hôpital , Famille : *Pseudomonadaceae*

- Habitat : *P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire, présente dans divers environnements humides : eaux, sols, surfaces hospitalières, et parfois dans la flore transitoire humaine (peau, voies respiratoires, urinaires), surtout chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés (Zidi et al., 2021).

– **Souche fongique :**

• ***Candida albicans* :**

Une levure pathogène responsable de *candidoses*, testée dans plusieurs mémoires consacrés à l'étude des propriétés antifongiques du romarin, Famille : *Saccharomycetaceae*

- Habitat : *C. albicans* fait partie de la flore commensale normale du corps humain, particulièrement présente au niveau de la bouche, du tube digestif, du vagin et de la peau. Elle devient pathogène en cas de déséquilibre du microbiote ou d'immunodépression. (Benyahia, al, 2019).

• **1.2 Les souches de références :**

• ***Candida albicans* ATCC 91234 :**

Est une levure appartenant à la famille des *Saccharomycetaceae*. C'est un champignon opportuniste capable de provoquer des infections lorsque l'équilibre de la flore microbienne est perturbé ou en cas d'immunodépression. Habitat : bouche, vagin, peau, tube digestif.

Elle possède un génome diploïde d'environ 14,5 Mb, composé de 8 paires de chromosomes, avec une grande plasticité génétique lui permettant d'adapter sa virulence et de développer des résistances.

Elle est largement utilisée dans les applications expérimentales, notamment dans l'étude de la morphogénèse (passage forme levure → hyphes), la formation de biofilm, et l'évaluation de l'activité antifongique de diverses substances naturelles.

La souche 91234 est fréquemment conservée dans des collections de laboratoire, en tant que souche de référence dans les études sur les composés antifongiques, en complément d'autres souches standards comme SC5314. (Calderone&Fonzi, 2001)

• ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923:**

Est un cocci Gram positif appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*, naturellement présent sur la peau, dans les narines et le pharynx. La souche ATCC 25923 est une souche de référence standard largement utilisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, notamment par la méthode de diffusion sur gélose (méthode Kirby-Bauer).

Son génome est entièrement séquencé, d'une taille d'environ 2,8 Mb, codant pour plus de 2600 protéines, incluant des gènes liés à la virulence, à l'adhésion et à la tolérance au stress environnemental.

Elle est utilisée dans de nombreuses applications microbiologiques, notamment pour l'évaluation de l'efficacité des antibiotiques ainsi que pour tester le potentiel antimicrobien de substances naturelles comme les huiles essentielles ou extraits végétaux.

Cette souche est conservée dans les collections de cultures standardisées, notamment à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le numéro ATCC 25923, et elle est fréquemment utilisée comme souche témoin positive dans les laboratoires cliniques et de recherche. **(Becker et al., 2014).**

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853:**

C'est un bacille Gram négatif appartenant à la famille *des Pseudomonadaceae*, largement distribué dans l'environnement (eau, sol) et connu pour sa capacité à provoquer des infections opportunistes, notamment en milieu hospitalier. La souche ATCC 27853, isolée d'une hémoculture, est largement utilisée comme souche de référence standard pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, notamment pour le contrôle qualité des milieux de culture tels que la gélose Mueller-Hinton. Son génome est entièrement séquencé, avec une taille d'environ 6,84 Mb et un contenu en GC de 66 %, codant pour plus de 6 300 protéines, incluant des gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilm. Cette souche est utilisée dans de nombreuses applications microbiologiques, telles que l'évaluation de l'activité antimicrobienne des antibiotiques classiques ou des extraits naturels, ainsi que dans l'étude des mécanismes de résistance bactérienne. Elle est conservée dans les collections de cultures standards, notamment à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le numéro ATCC 27853, et constitue une souche témoin positive de référence en microbiologie clinique. **Djouahri, L. (2019).**

- ***Escherichia coli* ATCC 25922 :**

C'est une souche de référence standard largement utilisée en microbiologie. Isolée à partir d'urine humaine, elle est conservée dans plusieurs collections internationales, telles que DSM 1100, CIP 7624 et NCTC 12241, ce qui en fait un modèle reconnu à l'échelle mondiale. Cette souche est principalement utilisée comme contrôle qualité dans les tests de sensibilité aux antibiotiques, notamment selon les protocoles CLSI et EUCAST, en raison de sa stabilité phénotypique et de sa reproductibilité. Elle sert également à l'évaluation des milieux de culture, des réactifs et des kits de diagnostic. Sur le plan génomique, *E. coli* ATCC 25922 possède un génome entièrement séquencé d'environ 5,1 millions de paires de bases, contenant près de 4800 gènes codants. Elle ne présente pas de gènes de résistance majeurs, ce qui renforce son rôle comme souche sensible de référence. Classée dans le groupe de risque 1, sa manipulation est autorisée dans les laboratoires de sécurité biologique de niveau 1 **(Boukhelifa, 2022).**

- ***Escherichia coli* ATCC 10538 :**

C'est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Également connue sous le nom de K-12 ou O Rough H48, cette souche de référence non pathogène fait partie de la flore intestinale normale et est largement utilisée comme modèle standard dans les tests de contrôle qualité et les analyses moléculaires. Elle a été adoptée comme souche témoin dans les services de séquençage génomique de nouvelle génération (NGS). Son génome a été entièrement séquencé, avec une taille comprise entre 4,6 et 5,1 mégabases, incluant un seul chromosome circulaire, et parfois de petits plasmides. Cette souche code pour plusieurs milliers de gènes, ce qui en fait un modèle fondamental pour l'étude de l'expression génique et de la génétique bactérienne. Ses applications incluent les tests de contrôle qualité des milieux de culture et des équipements de laboratoire, son utilisation comme contrôle positif dans les plateformes de séquençage comme Illumina HiSeq et MiSeq, ainsi que la recherche sur la production de protéines recombinantes à l'aide de plasmides. Elle porte le numéro de référence 10538, et correspond à d'autres désignations telles que DSM 11250 et NCIB 10083. Elle reste une souche standard utilisée dans les laboratoires de microbiologie du monde entier (**Blattner et al., 1997**)

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8626 :**

C'est une bactérie à Gram négatif, appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*, largement connue pour sa capacité à provoquer des infections opportunistes, notamment dans les milieux hospitaliers et industriels. La souche NCIMB 8626 est une souche de référence couramment utilisée dans les tests de tolérance aux conservateurs chimiques, en raison de sa résistance élevée à des agents tels que le chlorhexidine gluconate, le chlorure de benzalkonium ou encore le cétrimide.

Concernant son génome, bien qu'un séquençage complet spécifique à cette souche ne soit pas toujours disponible, il est reconnu qu'elle est dépourvue de plasmides et présente un profil de résistance intrinsèque remarquable, ce qui la rend précieuse dans les études de mécanismes de survie en milieu stressé.

Ses applications incluent :

- les tests de qualité des milieux de culture et d'efficacité des conservateurs dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques,
- l'évaluation de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens,
- l'utilisation comme souche témoin dans les laboratoires industriels et de recherche pour valider les protocoles d'essai. (**Unilever&Cardiff Microbiology, 2019**)

- ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538 :**

Est un cocci à Gram positif appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Il s'agit d'une souche standard fréquemment utilisée pour l'évaluation de l'efficacité des désinfectants et antiseptiques, notamment dans les normes européennes telles que EN 1276. Son génome, entièrement séquencé, est d'environ 2,8 Mb et code pour plus de 2600 gènes, incluant des facteurs de virulence et des mécanismes de survie en conditions environnementales. Cette souche est utilisée dans diverses applications microbiologiques, notamment les contrôles qualité dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques, ainsi que dans les tests de substances antimicrobiennes naturelles. Elle est conservée dans la collection de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro 6538, et également disponible dans d'autres banques de souches comme la DSMZ ou la NCTC. (McDonnell&Russell, 1999)

- ***Bacillus spizizenii* ATCC 6633 :**

Est une bactérie à Gram positif, de forme bacillaire, appartenant à la famille des *Bacillaceae*. Initialement classée comme *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, elle a été reclassée en tant qu'espèce distincte sur la base d'analyses génomiques et physiologiques. Cette souche est non pathogène et largement utilisée comme souche de référence dans les études de microbiologie alimentaire, les tests de biosécurité et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de composés naturels.

Son génome a été entièrement séquencé, avec une taille estimée entre 4,2 et 4,3 Mb, codant pour plus de 4000 gènes, incluant ceux impliqués dans la sporulation, la production d'enzymes extracellulaires (comme les protéases et les amylases), ainsi que les mécanismes de résistance au stress environnemental.

- **Parmi ses applications :**

- les essais d'efficacité des conservateurs et désinfectants,
- la production industrielle d'enzymes,
- les recherches sur la formation des spores,
- les tests d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des extraits végétaux et des huiles essentielles.

Cette souche est conservée dans la collection ATCC sous le numéro 6633, et est également disponible dans d'autres collections telles que la DSMZ (DSM 347) et la NCIMB. (Logan&De Vos, 2015)

Chapitre IV :

Matériel et Méthodes :

1 / Cadre de l'étude :

Ce projet de recherche a été réalisé au niveau des laboratoires suivants :

- L'extraction de l'huile essentielle (HE) des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. a été réalisée à Sidi Mezghiche.
- L'extraction hydroéthanolique et hydrométhanolique ainsi que les tests de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ont été effectués au laboratoire de l'Université du 20 Août 1955 de Skikda.
- Les souches bactériennes cliniques (provenant d'urines et de pus) ont été obtenues au laboratoire de Mezghache à Azzaba ainsi qu'au Centre de diagnostic médical El-Kindi à El Harrouche.
- Les tests de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ont été réalisés à l'Établissement Public de Santé de Proximité (EPSP) Merj Eddib – Kayouch Fadhila de Skikda.

2 / Matériels utilisés :**2 Matériel biologique :****2 -1 Matériel végétal :**

Dans ce travail, nous avons utilisé les feuilles d'une plante médicinale, il s'agit du romarin (*Rosmarinus officinalis* L).

A/ Récolte :

- La plante de *Rosmarinus officinalis* L a été récoltée le 19 mars 2025 à 08h45 au niveau de la région de Harrouch, précisément à Saïd Bousbaa, dans la wilaya de Skikda.
- Les paramètres géographiques des régions de récolte sont représentés dans le tableau 03.
- Le tableau suivant représente Les paramètres géographiques de la région de récolte de *Rosmarinus officinalis* L

Tableau 03 : Les paramètres géographiques de la région de récolte de *Rosmarinus officinalis* L

Station	Saïd Bousbaa
wilaya	Skikda
latitude	36.62 Nord
longitude	6.62 Est
altitude	150 m
Zone climatique	Climat méditerranéen

B -Séchage

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* L ont été séchées à l'air libre dans un endroit obscur jusqu'à dessiccation complète (pendant 14 jours).



Figure 02 : Feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* L (photo personnelle)

3 / Les souches testées :

Dans cette étude, 11 souches microbiennes présentant une résistance fréquente aux antibiotiques ont été sélectionnées. Elles comprennent à la fois des isolats d'origine clinique et des souches de référence (type ATCC), utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait hydroéthanolique et hydrométhanolique de *Rosmarinus officinalis*.

L'identification préliminaire des souches cliniques a été effectuée dans deux laboratoires : le Laboratoire Mezghache situé à Azzaba, et le Centre de diagnostic médical El-Kindi à El Harrouch. Par la suite, des analyses microbiologiques et biochimiques complémentaires ont été réalisées.

Le tableau suivant représente Les souches microbiennes testées

Tableau 04: Les souches microbiennes testées

Nom des souches microbiennes	Gram	Numéro ATCC	Origine
<i>Klebsilla pneumoniae</i> , clinique	Négative		Harrrouche
<i>Escherichia coli</i> , clinique	Négative		Azzaba
<i>Candida albicans</i> (clinique)			Harrrouche
<i>Candida albicans</i>		91234	Institut pasteur
<i>Staphylococcus aureus</i>	positive	25923	Institut pasteur
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	27853	Institut pasteur
<i>Escherichia coli</i>	Négative	25922	Institut pasteur
<i>Escherichia coli</i>	Négative	10538	Institut pasteur
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	8626	Institut pasteur

<i>Staphylococcus aureus</i>	positive	6538	Institut pasteur
<i>Bacillus spizizenii</i>	positive	6633	Institut pasteur

4/ Conservation des souches :

- Les souches ATCC ont été conservées à + 4°C dans le milieu de conservation LB dans des tubes à essai
- Les souches clinique ont été transportées dans des glacières dans des boîtes de Pétri ensemencés sur des milieux sélectifs.

5 / Méthodes :

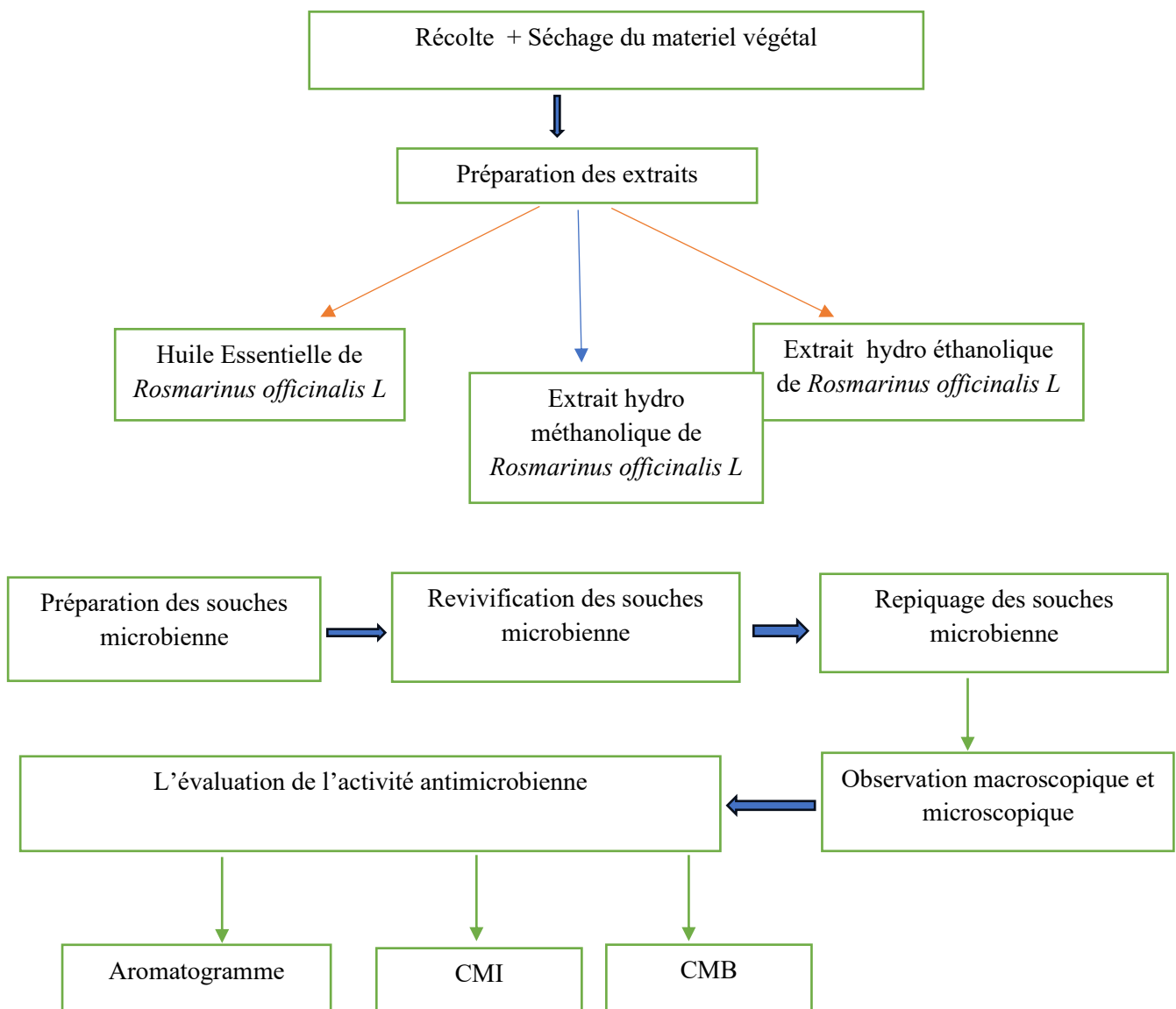
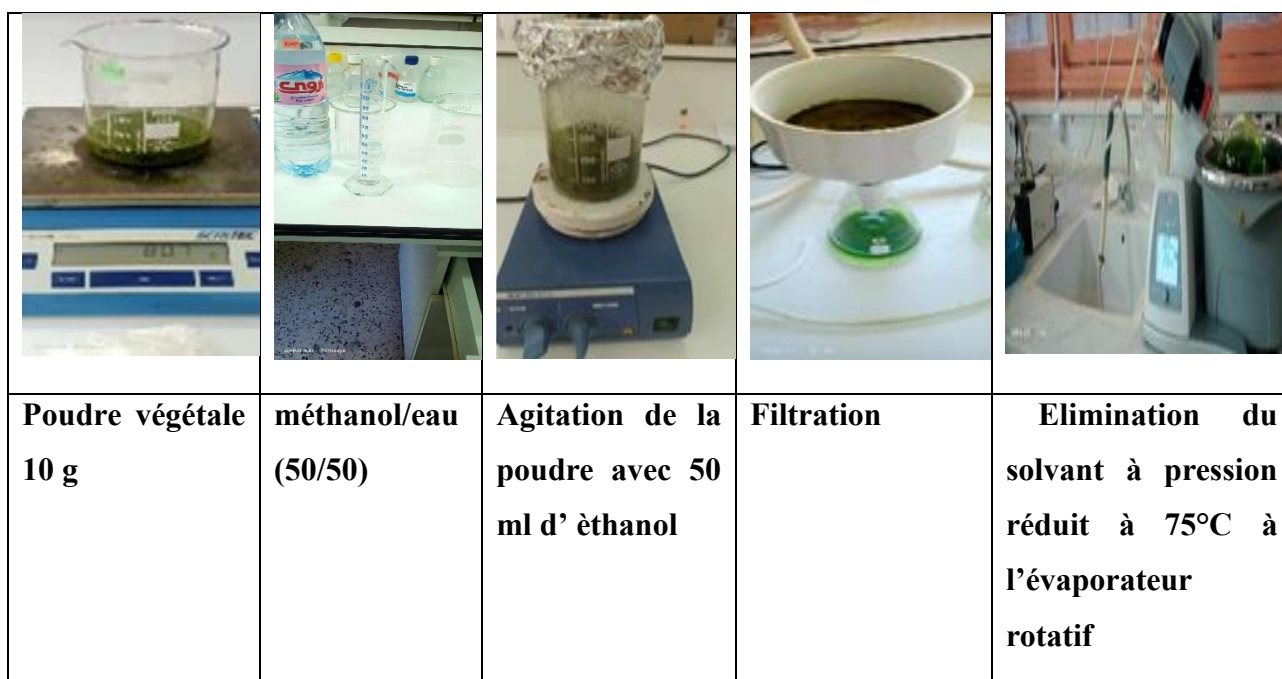


Figure 03 : Schéma général des méthodes expérimentales

5 -1 / Préparation de l'extrait hydro-éthanolique et hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L :

L'extrait hydro-méthanolique fut préparé par macération de 10,0 g de matière végétale sèche (poudre de feuilles de *Rosmarinus officinalis* L) dans 100,0 ml d'un solvant composé de méthanol/eau (50/50 :v/v) (Akroum, S. (2020)).

L'extrait hydro-éthanolique fut préparé par macération de 9 g de matière végétale sèche (poudre de feuilles de *Rosmarinus officinalis*) dans 100,0 ml d'éthanol/eau (72/18 : v/v). La macération dura 20 min et fut répétée trois fois. Par la suite, les surnageants furent récupérés par filtration et évaporés à sec à l'aide du rota-vapor. (Akroum, S. (2020)).



Figures 04 : Étapes de préparation de l'extrait hydrométhanolique (photo personnelle)

5 - 2 Protocole d'extraction des huiles essentielles :

- 20 kg des feuilles sèches ont été mélangés avec 50 litres d'eau distillé
- L'alambic est chauffé directement au gaz pendant environ 2h
- La chaleur fait bouillir l'eau, produisant de la vapeur.
- La vapeur entraîne les composés volatils présents dans les feuilles.
- Cette vapeur chargée en huile essentielle passe dans le condenseur où elle se condense.
- Le mélange obtenu (hydrolat + huile essentielle) est recueilli à la sortie du système de refroidissement dans une bouteille en verre.
- L'huile essentielle, plus légère, flotte à la surface de l'hydrolat.

- L'huile essentielle pure est ensuite récupérée à l'aide d'une ampoule à décanter
- L'huile essentielle pure est ensuite conservée au réfrigérateur + 4 °C dans un flacon sombre afin de la préserver de la lumière et de la chaleur



Figure 05 : Etape de l'extraction d'huile essentielle (photo personnelle)

5 - 3 Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après Hydro distillation sur la quantité de la plante à traiter exprimé en pourcentage (**Chantal et al., 2015**)

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$RHE = QHE / QP \times 100$$

RHE : rendement de l'huile essentielle en %.

QHE: quantité de l'huile essentielle en g.

QP : quantité de la plante en g.

5 - 4 Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme :

A/ Revivification des souches microbiennes :

Les souches microbiennes conservées ont été réactivées en prélevant un échantillon de chaque souche, que nous avons ensuite ensemencé dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures

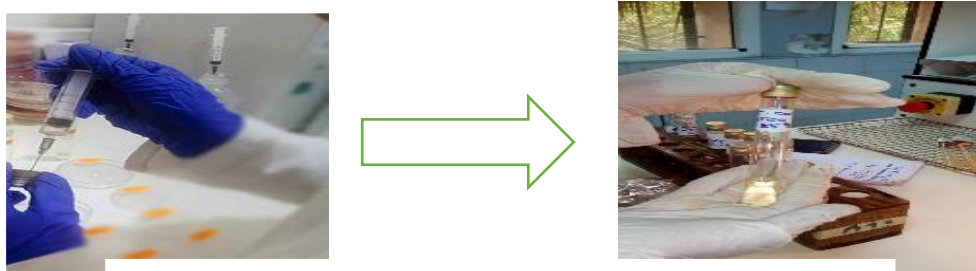


Figure 06 : Revivification des souches microbiennes

B/ Repiquage des souches microbiennes :

Le repiquage a pour but d'obtenir une culture microbienne récente et exempte de toute contamination. Pour cela, une méthode précise est suivie : une petite quantité du bouillon contenant la souche est prélevée, puis étalée en stries sur un milieu solide préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Le choix du milieu dépend du type de bactérie selon la coloration de Gram : la gélose de Chapman est adaptée aux bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, tandis que la gélose Hektoen est réservée aux bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* et *Klebsiella*, Sabouraud pour *Candida* (incuber à 30°C pendant 24h),

Une fois les milieux ensemencés, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Cette phase permet aux bactéries de se multiplier et de former des colonies distinctes, facilitant ainsi leur identification et leur isolement.



Figure 07 : Repiquage et incubation des souches microbiennes (photo personnelle)

C / Observation microscopique :

La manipulation a été réalisée de manière aseptique à proximité d'un bec Bunsen, à partir d'une culture sur milieu physiologique.

Une goutte d'eau stérile a été déposée sur une lame propre, exempte de toute contamination.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une petite quantité de colonie a été prélevée, puis déposée à côté de la goutte d'eau sur la lame.

L'échantillon a ensuite été délicatement émulsionné dans la goutte d'eau jusqu'à obtenir une suspension microbienne homogène.

La suspension a été recouverte d'une lamelle en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air, car celles-ci peuvent gêner l'observation microscopique.

L'observation a été effectuée à l'aide d'un microscope optique, avec un grossissement de 100 X et sous faible éclairage.

D/ Coloration de Gram :

La coloration de Gram est la méthode différentielle la plus couramment utilisée en bactériologie médicale. Elle permet de distinguer deux grands groupes de bactéries en fonction de la composition de leur paroi cellulaire : les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives, selon leur affinité pour certains colorants.

E/ Étapes de la méthode :

Application du cristal violet :

- Déposez le colorant cristal violet sur la lame et laissez agir pendant 60 secondes.
- Rincez ensuite la lame à l'eau douce.
- Application du lugol (iodé) :
- Recouvrez la lame de solution iodée (lugol) et laissez agir pendant 60 secondes.
- Rincez de nouveau la lame à l'eau.
- Décoloration à l'alcool éthylique :
- Versez de l'alcool éthylique sur la lame pendant 30 secondes.
- Cette étape permet de différencier les deux types de bactéries.
- Rincez immédiatement à l'eau.
- Contre-coloration à la Safranine :
- Appliquez la safranine sur la lame et laissez agir pendant 60 secondes.
- Rincez une dernière fois à l'eau.
- Après séchage, la lame est prête à être observée au microscope.
- Les bactéries Gram-positives apparaîtront violettes
- Les bactéries Gram-négatives apparaîtront roses



Figure 08 : Utilisation des réactifs de la coloration de Gram (cristal violet, lugol, alcool, safranine). (photo personnelle).

6 / Méthode de l'aromatogramme :

Il s'agit d'une méthode *in vitro* permettant d'évaluer l'effet antimicrobien d'une ou plusieurs substances actives extraites, appelées principes actifs. Elle consiste à déterminer le spectre d'activité de ces composés naturels sur différentes espèces microbiennes, afin de tester leur efficacité et de vérifier la sensibilité ou la résistance des micro-organismes pathogènes vis-à-vis de ces principes. (Boukhatem, Z. (2020).



Figure 09 : Représentation de la zone d'inhibition lors du test de sensibilité aux huiles essentielles par diffusion sur gélose Mueller-Hinton.

6 - 1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis L*

-Préparation des solutions : une quantité d'HE a été mélangé avec le solvant DMSO afin de préparer 4 dilutions.

- Le tableau suivant représente dilution d'HE de *Rosmarinus officinalis L*

Tableau 05 : Dilution d'HE de *Rosmarinus officinalis L*

Dilution 1 : D1 (10%)	Dilution: D2 (5%)	Dilution 3 : D3 (2,5%)	Dilution 4 : D4 (1,25%)
100 µL d'huile essentielle - 900 µL de DMSO	500 µL de D1 (10%) - 500 µL de DMSO	500 µL de D2 (5%) - 500 µL de DMSO	500 µL de D3 (2,5%) - 500 µL de DMSO

6 -2 Standardisation selon McFarland :

La standardisation selon McFarland est une méthode utilisée en microbiologie pour estimer la concentration bactérienne dans une suspension, en comparant la turbidité (l'opacité) de cette suspension à un étalon de référence

L'étalon 0,5 McFarland est le plus couramment utilisé et correspond à environ $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (unités formant colonie par millilitre) (**McFarland, J. (1907)**)

6 - 3 Ensemencement :

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, on l'essor en le pressant fermement, puis on le tourne sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. On frotte ensuite l'écouvillon sur la totalité de la surface Mueller Hinton sèche, en réalisant des stries serrées de haut en bas. Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, puis on a laissé sécher pendant 5 minutes.



Figure 10 : Etapes d'ensemencement sur Mueller Hinton par écouvillonnage

(photo personnelle)

6 -4 Application des disques :

A l'aide d'une micropipette on dépose 5 μ l de la solution mère sur les disques de papier filtre stériles (de 6 mm).

A l'aide d'une pince, on dépose les disques sur les boîtes préalablement ensemencées.

Un contrôle négatif a été effectué en déposant 5 μ l de DMSO sur des disques déposés dans chacune des boîtes de Pétri contenant 3 disques de la solution mère et ceci pour chaque souche bactérienne



Figure 11 : Dépôt des disques imprégnés de solution sur la géloseensemencée(photo personnelle)

6- 5 Incubation :

Les boîtes ont été laissées pendant 15 minutes à température ambiante pour permettre la diffusion de l'huile essentielle, puis elles ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. (30 °C pour candida)

A/ Expression des résultats :

Après la période d'incubation, la présence d'une activité se traduit par l'inhibition de la croissance de l'inoculum

7 / Activité antimicrobienne par la méthode des puits :

7 - 1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-ethanolique et de l'extrait hydro-methanlique *Rosmarinus officinalis* L :

7 .1 .1 Préparation des dilutions :

A/ Préparation des dilutions avec 9g/100ml (Éthanol 72 + Eau distillée 18) :

Chaque dilution a un volume final de 1 ml, avec un solvant composé de 72% éthanol et 18% eau distillée.

Selon l'équation : la concentration C1 a été préparé en diluant 9g du poudre de *Rosmarinus officinalis* L dans 100 ml du mélange hydroethanolique

$$C1.V1=C2.V2$$

C1 = 90 mg/ml (préparé avec 9g dans 100ml).

Le tableau suivant représente les dilutions de l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L

Tableau 06 : Dilutions de l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L

Concentration C2 (mg/ml)	Volume de la solution mère V1 (ml)	Volume de solvant (Éthanol + Eau distillée) (ml)	Volume final (ml)
10	0.111	0.889	1
25	0.278	0.722	1
50	0.556	0.444	1
75	0.833	0.167	1
100	Non réalisable	Non réalisable	1

B/ Préparation des dilutions à partir d'une solution mère (50% méthanol et 50% eau distillée.)

Chaque dilution a un volume final de 1 ml, avec un solvant composé de 50% méthanol et 50% eau distillée.

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$V1 = (10 \times 1) / 100 = 0.1$$

$$V1 = (25 \times 1) / 100 = 0.25$$

$$V1 = (50 \times 1) / 100 = 0.5$$

$$V1 = (75 \times 1) / 100 = 0.75$$

$$V1 = (100 \times 1) / 100 = 1$$

- Le tableau suivant représente dilutions de l'extrait hydrométhanolique de *Rosmarinus officinalis L*

Tableau 07 : Dilutions de l'extrait hydrométhanolique de *Rosmarinus officinalis L*

Concentration C2 (mg/ml)	Volume de la solution mère V1 (ml)	Volume de solvant (Méthanol + Eau distillée) (ml)	Volume final (ml)
10	0.10	0.90	1
25	0.25	0.75	1
50	0.50	0.50	1
75	0.75	0.25	1
100	1.00	0.00	1

7- 1-2 Standardisation selon McFarland :

La standardisation selon McFarland est une méthode utilisée en microbiologie pour estimer la concentration bactérienne dans une suspension, en comparant la turbidité (l'opacité) de cette suspension à un étalon de référence

L'étalon 0,5 McFarland est le plus couramment utilisé et correspond à environ $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (unités formant colonie par millilitre) (**McFarland, J. (1907)**)

7 - 1-3 Ensemencement :

L'ensemencement des boîtes de Pétri pour cette méthode a été réalisé de la même façon que celle de la méthode des disques ou aromatoگرامme. Après ensemencement, un puits de 6mm de diamètre est creusé à l'aide d'une pipette pasteur stérile au centre de la gélose MH, au niveau duquel est coulée un volume (50µl,) de l'extrait hydroéthanolique et hydrométhanolique, les extraits ont été répétés 3 fois sur chaque boîte

7- 1-4 Méthode des puits :

La méthode des puits appliquée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et celle décrite par **Gulluce et al., 2007**.

➤ Principe :

Un puits (d'environ 6mm) est creusé à l'aide de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle (5µl et 10µl). Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées

➤ Incubation :

. les boîtes de Pétri ont été laissées à température ambiante pendant environ une heure afin de permettre la diffusion naturelle de l'extrait dans le milieu, avant d'être incubées à 37 °C pendant 24 heures. 30 C° pour *candida albicans*

➤ Expression des résultats :

La lecture des résultats de la méthode des puits se fait par mesure des diamètres d'inhibitions autour du puits en millimètre

8 /Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de *Pseudomonas aeruginosa* ;

8- 1 Préparation de la solution d'huile essentielle :

Nous avons préparé une solution mère en mélangeant 88,9 µL d'huile essentielle avec 911,1 µL de DMSO. Ce mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes, puis conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

8- 2 Détermination de la CMI :

Des dilutions successives (1/2) de l'huile essentielle ont été effectuées dans du bouillon Mueller-Hinton. À chaque dilution, 1 ml d'une suspension bactérienne (~10⁶ UFC/ml) a été ajouté. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration ne montrant aucune turbidité visible, c'est-à-dire aucune croissance bactérienne. (**Hancock, R. E. W. (2008)**)



Figure 12 : Comparaison entre la suspension bactérienne et le contrôle positif (prise personnelle)

L'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24 h.

8- 3 Détermination de la CMB :

À partir des tubes présentant une absence de turbidité (correspondant à la CMI et aux concentrations supérieures), un volume de 100 μ L de chaque suspension a été prélevé de manière aseptique, puisensemencé par étalement en surface homogène sur des boîtes de gélose Mueller-Hinton préalablement préparées.

L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une spatule stérile, afin de garantir une distribution uniforme de l'inoculum.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures.

La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la plus faible concentration d'extrait ne présentant aucune croissance bactérienne visible, c'est-à-dire une absence totale de colonies sur la surface de la gélose (**Hancock, R. E. W. (2008)**)

Chapitre V : Résultats et Discussion

1- Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L :

Le tableau suivant représente le Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L :

Tableau 08 : Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L

Plante	La masse de l'EH de rosmarin (g)	Poudre végétale (g)	Le rendement de l'huile essentielle %
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	9	20000	0.045

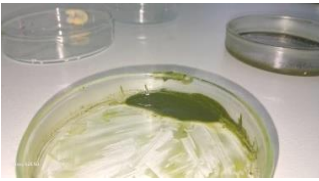

Le rendement en huile essentielle obtenu dans notre étude est de 0,045 % (soit environ 9 g pour 20 kg de matière végétale fraîche), ce qui demeure très faible comparé aux résultats rapportés dans les travaux algériens. En effet, une étude réalisée par Moussaoui et Boualleg (2021) a examiné le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L prélevé dans trois régions algériennes : Souk Ahras, Jijel et Taoura. Les auteurs ont obtenu des rendements variant de 0,86 % pour les fleurs de Jijel, jusqu'à 2,7 % pour les feuilles de la même région, et atteignant un maximum de 5,84 % pour les feuilles récoltées à Taoura.

Ces différences marquées peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, notamment la partie de la plante utilisée (fleurs vs feuilles), les conditions climatiques et géographiques, la méthode d'extraction, l'état de la matière végétale (fraîche ou sèche), ainsi que les caractéristiques du sol.

2 -les Extraits hydro-éthanoliques et hydro- méthanolique :

Tableau suivant présente caractéristiques les Extraits hydro-éthanoliques et hydro-méthanolique

Tableau 09 : Caractéristique des extraits hydro- éthanolique et hydro- méthanolique

La plante : <i>Rosmarinus officinalis L</i> :	Caractéristique	Figure
l'extrait hydro-éthanolique	Couleur : vert Aspect : homogène. État physique : poudre	
l'extrait hydro-méthanolique	brun foncé à presque noir. Aspect : visqueux. État physique : pâteux	

Conservez l'extrait sec au réfrigérateur pour les tests ultérieurs

2-1 Extrait hydro-éthanolique

- Tableau suivant présente rendement de l'extrait éthanol de *Rosmarinus officinalis L*

Tableau 10 : Le rendement de l'extrait éthanol de *Rosmarinus officinalis L*

Plante	La masse de l'extrait (g)	Poudre végétale (g)	Le rendement de l'extrait %
<i>Rosmarinus officinalis L</i>	0,4	9	4,4

2-2 Extrait hydro-méthanolique

Tableau suivant présente rendement de l'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis L*

Tableau 11 : Rendement de l'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis L*

Plante	La masse de l'extrait (g)	Poudre végétale (g)	Le rendement de l'extrait %

<i>Rosmarinus officinalis</i> L	0,6	10	6
---------------------------------	-----	----	---

Le rendement d'extrait hydroéthanolique de *Rosmarinus officinalis* L de cette étude est 4,4%


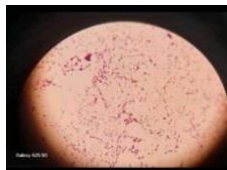

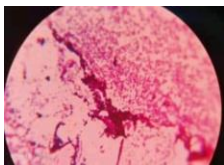

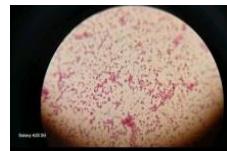

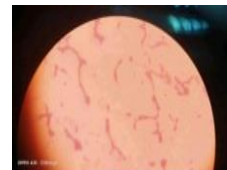
Le rendement d'extrait hydrométhanolique de *Rosmarinus officinalis* L de cette étude est 6%

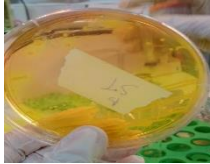
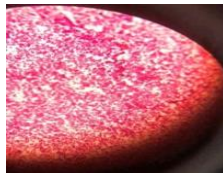
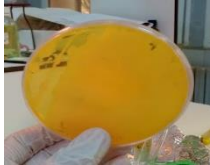
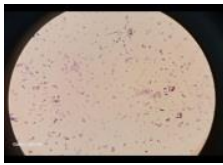


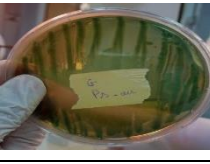
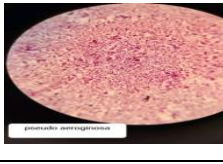
Dans cette étude, le rendement d'extraction hydroéthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. a été de 4,4 %, tandis que le rendement d'extraction hydrométhanolique a atteint 6 %. En comparaison avec une étude publiée dans une revue scientifique internationale, ces valeurs apparaissent relativement faibles. En effet, une recherche menée par Tavassoli et Djomeh (2011) a rapporté un rendement d'extraction hydrométhanolique de 18,9 % à partir des feuilles sèches de romarin, en utilisant la méthode Soxhlet. Cette différence significative peut être expliquée par plusieurs facteurs tels que la méthode d'extraction, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction, ainsi que l'état de la matière végétale (fraîche ou sèche, finement broyée ou non).

3-Identifications des souches microbiennes

- Le tableau suivant représente Observation macroscopique et microscopique les souches

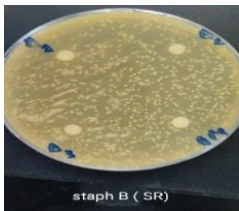
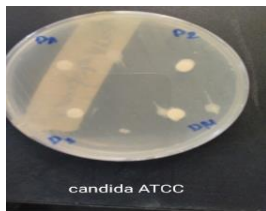

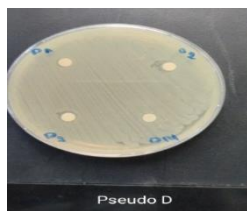
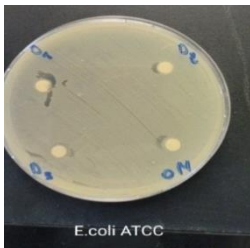
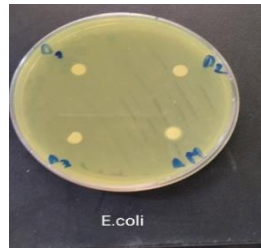
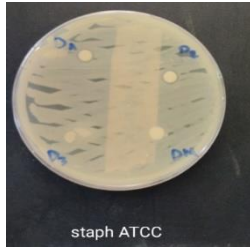
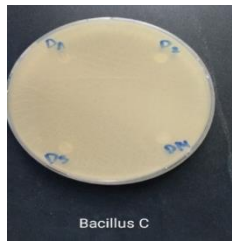
Tableau12 : Observation macroscopique et microscopique les souches (photo personnelle)

Les souches microbienne	Observation macroscopique	Observation microscopique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	 Rouge aspect visqueux Contour régulier	 <i>Bacilles Gram négatif</i>
<i>Escherichia coli</i> <i>clinique</i>	 Jaune forme circulaire Relief semi-bombe Contour régulier Surface lisse	 <i>Bacilles Gram négatif</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	 Jaune aspect visqueux Contour régulier Surface lisse	 <i>Cocci Gram positif</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>clinique</i>	 Jaune doré Relief semi-bombe Contour régulier bien arrondie Surface lisse	 <i>Cocci Gram positif</i>

<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p>	 <p>a la surfase</p>	<p>Colonies circulaire lisse , opaque de couleur dorée à jaune Aspect brillant</p>	 <p><i>Cocci Gram positif</i></p>
<p><i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 66333</p>		<p>Colonies sèches rugueuses blanches à crème</p>	 <p>Bacille Gram positif</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 8626</p>		<p>Colonies larges à bords réguliers et ont surface lisse et brillante</p>	 <p>Bacille Gram négatif</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>		<p>Colonies lisses , couleur bleu vert</p>	 <p>Bacille Gram négatif</p>

4-L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L

- Les figures suivantes représentent l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L sur les souches microbienne

 <p>staph B (SR)</p>	 <p>candida ATCC</p>	 <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC</p>	 <p>Pseudo D</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p>	<p><i>Candida albicans</i> ATCC 23491</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 8626</p>
 <p>E.coli ATCC</p>	 <p>E.coli</p>	 <p>staph ATCC</p>	 <p>Bacillus C</p>

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633
---------------------------------------	-------------------------	--	---

Figure13 : L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L

Le tableau suivant représente les diamètres des zones d'inhibitions de HE de *Rosmarinus officinalis* L

Tableau13: Les diamètres des zones d'inhibitions de HE de *Rosmarinus officinalis* L

Les souches microbiennes	Moyenne + écart type (mm)	Le contrôle négatif (DMSO)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Candida albicans</i> ATCC 91234	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 8626	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Escherichia coli</i> clinique	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6 ±0	6 (-)	Résistante
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	6 ±0	6 (-)	Résistante

- **Résistante (-)** : diamètre < 8 mm
- **Sensible (+)** : 9 mm ≤ diamètre < 14 mm
- **Très sensible (++)** : 14 mm ≤ diamètre < 19 mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre ≥ 20 mm



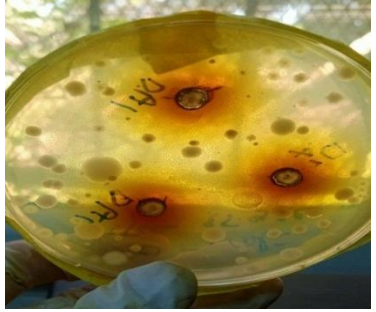
Les résultats de notre étude ont montré que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. n'a présenté aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées, avec un diamètre des zones d'inhibition de 6 ± 0 mm, ce qui reflète une absence totale d'inhibition et donc une résistance des micro-organismes dans les conditions expérimentales appliquées. Les souches testées incluent *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. En revanche, une étude algérienne menée par Boutabia et al. (2016) sur des huiles essentielles extraites de *R. officinalis* récolté dans la région de Hammamet (Tébessa, Algérie) a révélé une activité antibactérienne significative, notamment contre *E. coli* et *S. aureus*, avec des diamètres de zones d'inhibition notables, en utilisant la méthode de diffusion sur gélose.





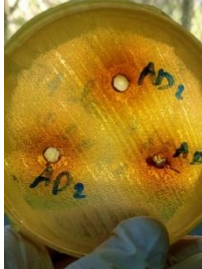
Cette divergence de résultats peut s'expliquer par les différences au niveau des conditions environnementales, des méthodes d'extraction, ainsi que de la composition chimique des huiles essentielles.

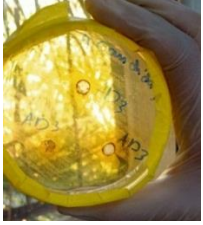

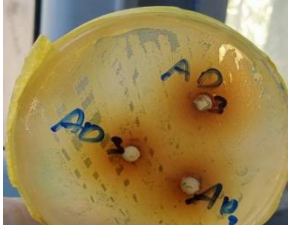


5-L'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique





Ces figures représentent les zones d'inhibition formées par l'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L contre différentes souches antimicrobiennes selon 05 dilutions méthode de Kirby-Bauer

– extrait hydro- méthanolique :

<p>Dilution 1 : 10 mg/ml</p>			
	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853</p>	<p><i>Escherichia coli</i></p>	<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>

<p>Dilution 02 : 25mg/ml</p>					
	<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p><i>Candida albicans</i> ATCC 91234</p>	<p><i>Pseudomonas aureus</i> ATCC27853</p>	<p><i>Escherichia coli</i></p>	<p><i>Escherichia coli</i> ATCC25922</p>

Dilution 03 : 50mg/ml					
	<i>Candida albicans</i> ATCC 91234	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> clinique	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923

Dilution 04 : 75mg/ml				
	<i>Escherichia coli</i> clinique	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> ATCC 91234

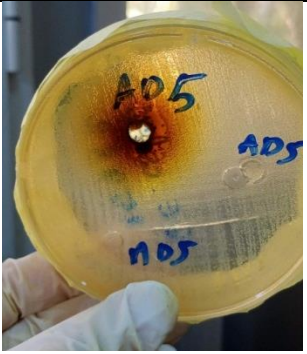

Dilution 05 : 100mg/ml		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Candida albicans</i> ATCC91234

Figure 14 : Zones d'inhibitions induites par l'extrait hydrom-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L contre différentes souches microbiennes (dilutions 01,02,03,04,05)

Le tableau suivant représente le Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-méthanolique

Tableau14 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-méthanolique

	moyenne dilution 10 mg/ml ± écart-type (mm)	moyenne dilution 25 mg/ml ± écart-type (mm)	moyenne dilution 50 mg/ml ± écart-type (mm)	moyenne dilution 75mg/ml ± écart-type (mm)	moyenne solution mère 100 mg/ml ± écart-type (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22 ± 1	9 ± 1,53	7 ± 0,58	/	9 ± 0
<i>Escherichia coli</i> clinique	7 ± 1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0,58	6 ± 0,58	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		16 ± 1,73	20 ± 1,73	14 ± 0	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 91234		8 ± 1,15	8 ± 1,15	6 ± 0	6 ± 0

/ : non disponible

- **Résistante (-)** : diamètre < 8 mm
- **Sensible (+)** : 9 mm ≤ diamètre < 14 mm
- **Très sensible (++)** : 14 mm ≤ diamètre < 19 mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre ≥ 20 mm

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. ont révélé une efficacité variable selon les souches testées. La plus grande zone d'inhibition a été enregistrée contre *Escherichia coli* ATCC 25922, atteignant 22 ± 1 mm à la concentration la plus élevée, tandis que la souche clinique de la même bactérie a montré une réponse faible ne dépassant pas 7 mm. Une activité notable a également été observée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, notamment aux concentrations intermédiaires, avec des zones d'inhibition comprises entre 14 et 20 mm. En revanche, l'effet inhibiteur contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Candida albicans* ATCC 91234 est resté faible, ne dépassant pas 8 mm.

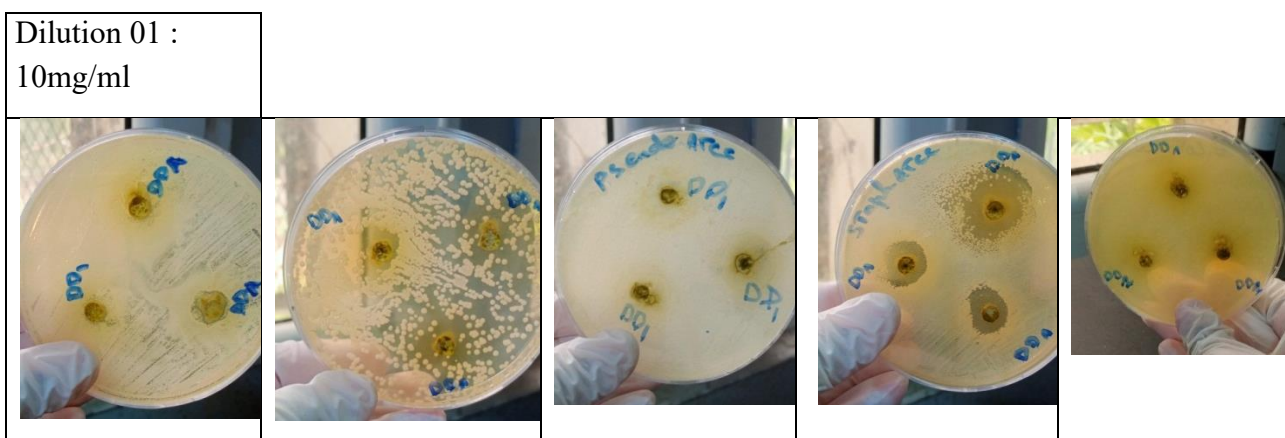
Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Mirouche et al. (2023), où l'extrait hydrométhanolique du même végétal a montré une efficacité significative contre *E. coli*, mais aucun effet contre *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de l'extrait dépend du type de microorganisme et de la concentration utilisée.

La variabilité de l'efficacité observée peut être expliquée en partie par la différence structurale entre les bactéries Gram positif et Gram négatif. En effet, les bactéries Gram négatif, telles que *E. coli* et *P. aeruginosa*, possèdent une membrane externe riche en lipopolysaccharides, qui agit comme une barrière protectrice contre les agents antimicrobiens. Cela rend particulièrement certaines souches, comme *P. aeruginosa*, très résistantes. En revanche, les bactéries Gram positif comme *S. aureus* ont une paroi cellulaire plus épaisse mais plus perméable, ce qui pourrait expliquer leur sensibilité plus marquée à l'extrait. Ces observations mettent en évidence l'importance de la structure bactérienne dans la réponse aux extraits végétaux. (Madigan et al., 2021).

6-L'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique :

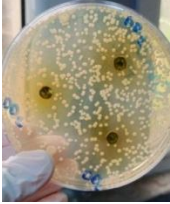




Ces figures représente les zones d'inhibition formées par l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L contre différentes souches antimicrobiennes selon 04 dilution

– extrait hydro-éthanolique :


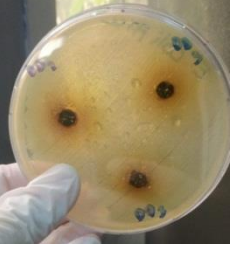


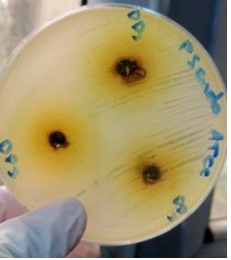


<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC91234	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Echirichia coli</i> ATCC25922
-------------------------	--------------------------------------	--	---	-------------------------------------

Dilution 02 :
25mg/ml

				
<i>Candida albicans</i> ATCC91234	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922

Dilution 03 :
50mg/ml

				
<i>Candida albicans</i> ATCC 91234	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853

Dilution 04 :
75mg/ml

				
---	---	---	--	---

<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC91234
--------------------------------------	---	--	-------------------------	--------------------------------------

Figure 15 : Zones d'inhibition formées par les quatre dilutions de l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L contre différentes souches microbiennes

Le tableau suivant représente le Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique

Tableau15 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique

	moyenne dilution 10mg/ml ± écart-type (mm)	Moyenne dilution 25mg/ml ± écart-type(mm)	moyenne dilution 50mg/ml ± écart-type(mm)	moyenne dilution 75mg/ml ± écart-type(mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9 ± 2	9 ± 2,52	9 ± 1,53	10 ± 2,31
<i>Escherichia coli</i> clinique	9 ± 0,58	7 ± 1	9 ± 0	8 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7 ± 1	9 ± 2,31	8 ± 1,53	8 ± 0,58
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20 ± 5,51	18 ± 2,65	14 ± 4,16	15 ± 3,46
<i>Candida albicans</i> ATCC 91234	13 ± 2,08	12 ± 2,08	13 ± 3,79	12 ± 2,52

- **Résistante (-)** : diamètre < 8 mm
- **Sensible (+)** : 9 mm ≤ diamètre < 14 mm
- **Très sensible (++)** : 14 mm ≤ diamètre < 19 mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre ≥ 20 mm

Les résultats de cette étude montrent que l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. possède une activité antimicrobienne notable, en particulier contre les bactéries à Gram positif

telles que *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 14 et 20 mm. En revanche, une activité plus faible a été observée vis-à-vis des bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec des diamètres n'excédant pas 10 mm. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par Boutabia et *al.* (2016) dans une étude algérienne menée à Hammamet (Tébessa), où les huiles essentielles de romarin ont montré une efficacité plus marquée contre *S. aureus* que contre *E. coli*.

Cette différence d'efficacité est généralement attribuée à la structure de la paroi cellulaire des deux types bactériens. Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi épaisse composée principalement de peptidoglycane, ce qui permet une meilleure diffusion des composés bioactifs. En revanche, les bactéries à Gram négatif présentent une membrane externe supplémentaire riche en lipopolysaccharides, qui agit comme une barrière sélective limitant l'accès des agents antimicrobiens, rendant ces bactéries souvent plus résistantes aux substances naturelles ou synthétiques. (Madigan et al., 2021).

7-Résultats de la CMI de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

La figure suivante représente les résultats de CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L et le contrôle positif

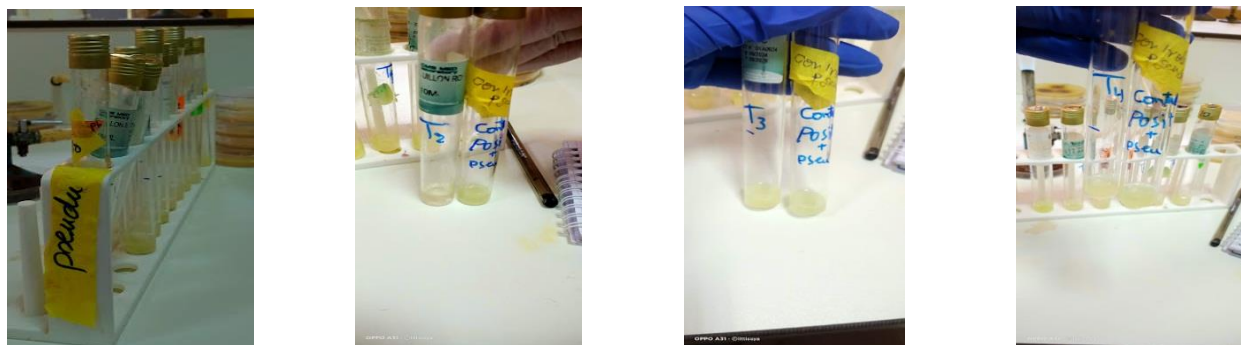


Figure 16 : Comparaison entre les résultats de CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L et le contrôle positif

Le tableau suivant représente Les résultats de CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L

Tableau 16 : Les résultats de CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L

souche bactérienne	Les concentrations (mg /ml)									
	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	-	-	-	CMI	+	+	+	+	+	+
---	---	---	---	---	-----	---	---	---	---	---	---

(-) : présence de croissance.

(+) : absence de croissance

En se basant sur nos résultats relatifs à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, il a été observé une inhibition de la croissance bactérienne à la concentration de 40 mg/ml, alors qu'elle persiste à 10 mg/ml, ce qui indique que la CMI se situe entre 10 et 40 mg/mm. Ces résultats traduisent une activité modérée de l'huile essentielle vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, ce qui peut s'expliquer par la structure particulière de leur paroi cellulaire, dotée d'une membrane externe limitant la pénétration des composés actifs.

Ces observations sont en accord avec une étude algérienne réalisée par Chama et al. (2022) dans la région de Sidi Bel Abbès, où l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L a montré une activité inhibitrice contre la même souche bactérienne avec un diamètre de zone d'inhibition de 13 mm. Cela confirme le potentiel antimicrobien de cette plante, bien que l'efficacité varie en fonction de la méthode d'extraction et de la concentration des composés bioactifs.

Ainsi, il est possible de conclure que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L possède des propriétés antimicrobiennes intéressantes. Une amélioration des conditions d'extraction et une augmentation de la concentration pourraient renforcer cette efficacité, ce qui en fait un candidat naturel prometteur dans les domaines médicaux et agroalimentaires, comme alternative potentielle aux antibiotiques chimiques.

V/ 8-Résultats de la CMB de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

La figure suivante représente les résultats de CMB de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L



Figure 17 : Les résultats de CMB de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L

Le tableau suivant représente Les résultats de CMB de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L

Tableau17 : Les résultats de CMB de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L

souche bactérienne	Les concentrations (mg /ml)									
	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	+	+	+	/	/	/	/	/	/

(-) : aucune croissance : absence de colonies dans les boîtes de Pétri

(+) : une croissance : présence de colonies dans les boîtes de Pétri

Les résultats obtenus montrent que la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se situe entre 10 et 40 mg/ml. Cette plage de concentration indique une activité bactéricide modérée, nécessitant une certaine dose pour inhiber totalement la croissance bactérienne. Ces données sont en accord avec celles rapportées par Hezil et al. (2022), dans une étude algérienne menée dans la région de Blida, où l'huile essentielle de romarin a démontré une CMB située aux alentours de 7,5 mg/ml contre *Escherichia coli*, une autre bactérie à Gram négatif. Cette cohérence entre les deux études suggère que *R. officinalis* possède un potentiel intéressant comme agent antibactérien naturel, bien que son efficacité soit parfois réduite face aux bactéries à Gram négatif, connues pour la complexité de leur membrane externe qui limite la pénétration des composés actifs.

Conclusion

Cette étude a révélé des résultats variés confirmant le potentiel de *Rosmarinus officinalis* L. comme source naturelle prometteuse de composés bioactifs. Le rendement de l'extrait hydro-méthanolique a été le plus élevé avec 6 %, suivi par l'extrait hydro-éthanolique avec 4,4 %, tandis que l'huile essentielle a présenté un rendement très faible, ne dépassant pas 0,045 %. Lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'huile essentielle n'a montré aucune zone d'inhibition contre les souches testées, ce qui suggère une absence d'activité dans les conditions expérimentales utilisées. Ce résultat peut être attribué soit à une faible concentration effective en composés actifs, soit à une dégradation de ces derniers durant le processus de distillation.

En revanche, les extraits alcooliques — particulièrement l'extrait hydro-méthanolique — ont affiché une activité notable, notamment contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) 20 mm concentration 50mg /ml, tandis que l'efficacité était plus faible contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), probablement en raison de la présence de la membrane externe riche en lipopolysaccharides qui limite la pénétration des agents antimicrobiens. La levure *Candida albicans* a montré une résistance à l'extrait hydro-méthanolique (8 ± 0 mm avec la concentration 25 mg /ml), et une sensibilité vis-à-vis de l'extrait hydro-éthanolique (14 mm).

Globalement, l'extrait hydro-méthanolique s'est révélé plus efficace que l'extrait hydro-éthanolique, soulignant l'influence du solvant utilisé sur l'extraction des principes actifs. Ces résultats confirment qu'il y a une différence notable entre les différents extraits de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L.

Ceci ouvre des perspectives dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire, à condition d'approfondir les analyses chimiques et de mener des études *in vivo* pour valider l'efficacité et l'innocuité de ces produits naturels.

Perspectives :

Les extraits de romarin (huile essentielle et hydroalcooliques) démontrent une activité antimicrobienne prometteuse, ouvrant des perspectives dans :

1. Formulations innovantes :

- Synergies avec antibiotiques ou autres huiles essentielles.
- Systèmes de délivrance avancés (nanoémulsions, liposomes).

2. Applications pratiques :

- Agroalimentaire : Conservateurs naturels (emballages actifs).
- Santé : Désinfectants topiques et compléments pour infections.
- Agriculture: Biopesticides contre pathogènes.

3. Recherche future :

- Études précliniques (toxicité, efficacité *in vivo*).
- Analyse mécaniste (mode d'action, lutte contre la résistance).

4. Valorisation durable

- Techniques d'extraction vertes (micro-ondes, ultrasons).
- Standardisation des extraits (HPLC, GC-MS).

Les Références bibliographiques :

A

Akshay, K., Anubha, S., & Anurag, M. (2019). Pharmacological potential and phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* L. : an overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 479–487.

Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(2), 124–130.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5–16.

Akroum, S. (2020). Activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* sur les espèces du genre *Candida* et sur *Streptococcus pneumoniae*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2020.06.003>

Aouzal, B. (2025). Modération des effets toxiques du fongicide Tébuconazole par l'extrait de *Ruta montana* chez le rat Wistar [Thèse de doctorat, Université du 20 Août 1955 - Skikda]. Manuscrit non publié.

B

Babaei, F., et al. (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(9), 1100–1112. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.45624.10716>

Becker, K. et al. (2014). *Clinical Microbiology Reviews*.

Benyahia, A. (2019). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* L. sur des souches bactériennes pathogènes [Mémoire de Master, Université de Blida 1].

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2007). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879–7885. DOI : 10.1021/jf0715323

Borrás-Linares, I., et al. (2014). Phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*, antioxidant and neuroprotective activities. *Molecules*, 19(6), 8526–8539. DOI : 10.3390/molecules19068526

Bouras, M. (2019). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante médicinale « *Eucalyptus globulus* ». Thèse de Master, Université Badji Mokhtar-Annaba.

Boukhatem, Z. (2020). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes [Mémoire de master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou]. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Boudraa, A., Bouraoui, W., Lakikza, H., & Makhlouf, A. (2024). Activité antibactérienne des deux plantes de la famille des Anacardiaceae et des Myrtaceae [Mémoire de Master, Université du 20 Août 1955 – Skikda]. Faculté des Sciences, Département des Sciences de la Nature et de la Vie.

Boutabia L., Telailia S., Bouzidi A., Djahoudi A. (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174–189.

Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa, Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174–189.

Boukhelifa, N. (2022). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits naturels contre des souches de référence et cliniques d'*Escherichia coli*. Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira – Béjaïa, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462

C

Calderone, R.A., & Fonzi, W.A. (2001). *Infection and Immunity*.

Cerra-Dominguez, J., et al. (année). Chapter 1 – A review of medicinal plants used as antimicrobials in Colombia.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (1995). Broth microdilution method for determining the MIC of essential oils. *Microbios*, 82(332), 181–185

CLSI. (2023). M07: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th ed.

Chama, Z., Benchiha, N. N., Benabbou, A., et al. (2022). Evaluation of the antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Rosmarinus eriocalyx* from the region of Sidi Bel Abbes (Algeria). *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, 8(2), 12–24.

D

Daira, H., Fadili, W., et al. (2016). Évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. *Journal Algérien des Régions Arides*, 10(2), 27–37.

Donnenberg, M.S. (2002). *Escherichia coli* : Virulence Mechanisms.

Djouahri, L. (2019). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales sur des souches multirésistantes. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1)

F

Fadili, W., Daira, H., et al. (2015). Étude comparative de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles : *Rosmarinus officinalis* L. et *Thymus vulgaris*. *Revue des BioRessources*, 5(2), 55–63.

G

Ghedira, K. (2005). Les composés phénoliques dans les plantes médicinales et leurs propriétés pharmacologiques. Université de Tunis.

Gonzalez-Trujano, M. E., et al. (2007). Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 67–71.

González-Minero, F.J., Bravo-Díaz, L., Ayala-Gómez, A. (2020).

González-Vallinas, M., Reglero, G., & Ramírez de Molina, A. (2015). Extrait de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) en tant qu'agent complémentaire potentiel dans la thérapie anticancéreuse. 67(8) :12219.

H

Hamdani, A. (2017). Activité biologique et antimicrobienne des huiles essentielles de romarin *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Blida. Mémoire de Master, Université Blida 1.

Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamidpour, M., & Shahlari, M. (2017). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) : A novel therapeutic agent for anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial uses – A review. *Journal of Biomedical Science and Research*, 3(3), 1–8.

Harrane, A. (2012). Les plantes médicinales et leurs effets biologiques. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Hezil, D., Benseghir, H., Benamrouche, S., Zaidi, S., Zineddine, R., Bessas, A., & Msela, A. (2022). Chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil from Algeria (region of Blida). *Agriculture (Algeria)*, n° 119-120, 24 pp.

I

Ibarra, A., et al. (2010). Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol and triglyceride levels in mice on a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 104(8), 1187–1194. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002030>

J

Jeevalatha, A., Kalaimathi, R., Basha, A. N., et al. (2022). Profile of bioactive Compounds in *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(1), 114–122.

K

Khelifa, N. (2019). Étude des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de *Rosmarinus officinalis* L. Mémoire de fin d'études, Université de Skikda.

L

Leplat, M. (2017). Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Thèse de doctorat. Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie.

Lešnik, S., Furlan, V., & Bren, U. (2021). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) : Extraction techniques, analytical Methods, and health-promoting Biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1273–1328.

Logan, N. A., & De Vos, P. (2015). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–163). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00905>

M

Makhloufi, A. (2013). Étude phytochimique et activité biologique d'extraits de *Rosmarinus officinalis* L. Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945, Guelma.

Manilal, A., et al. (2021). Activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* contre les isolats cliniques multirésistants et les agents pathogènes transmis par la viande. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021.

Moreno, S. et al. (2006). Antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* against bacterial and fungal strains. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1–2), 43–48.

Mostefai, A. (2012). Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiacées) dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176–1178.

Moussaoui, I. & Boualleg, S. (2021). Étude physico-chimique de l'huile essentielle du romarin sauvage. Mémoire de Master, Université de Souk Ahras, Algérie

McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.

Mirouche, H., Boulebghal, M., & Benlamari, S. (2023). Effet antibactérien d'une plante médicinale « *Rosmarinus officinalis* ». Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945, Guelma.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Biologie des micro-organismes* (16e éd., traduction française). Pearson Éducation France.

P

Pájaro-González, Y., et al. (année). Chapter 1 – A review of medicinal plants used as antimicrobials in Colombia.

R

Rodriguez Salazar, M., et al. (2019). Antioxidant and Biological Activity of *Cissus sicyoides* and *Rosmarinus officinalis* Extracts.

S

Sofowora, A. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique*. Éditions Karthala. Disponible sur : <https://books.google.dz>

Sales, A. J., & Pashazadeh, M. (2020). Study of Chemical Composition and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(1), 62–69. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.693371>

T

Tavassoli, S., & Djomeh, Z.E. (2011). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Veterinaria*, 7(4), 337–341.

U

Unilever&Cardiff Microbiology. (2019). Industrial *Pseudomonas aeruginosa* strains: preservative tolerance and genetic analysis. *Microbial Genomics*, 5(4): e000276.

V

Vázquez-Roncero, A., Martínez-Sánchez, A., et al. (2021). Antioxidant and neuroprotective effects of rosemary extract : A review of mechanistic pathways. *Journal of Functional Foods*, 85, 104623.

W

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Z

Zidi, M., Houilia, S.,&Malki, S. (2021). Évaluation des activités biologiques des extraits de *Rosmarinus officinalis* contre des souches bactériennes et fongiques isolées dans la région [Mémoire de Master, Université Larbi Ben M’hidi – Oum El Bouaghi]

ANNEXE

<i>Klebsiella pneumoniae</i> ECBU(infection Urinaire)	ATB	diamètre	Sensibilité des souches microbienne
	AMX	6mm	R
	AMC	6mm	R
	CZO	6mm	R
	CFM	12mm	R
	CTX	6mm	R
	IPM	23mm	S
	AK	20mm	S
	GN	18mm	S
	CIP	6mm	R
	CST	/	S
	FOF	8mm	R
	SXT	6mm	R
	C	12mm	R
	F/M	6mm	R

<i>Echerichia coli</i> Pus (infection de plaie ou abcès)	ATB	diamètre	Sensibilité des souches microbienne
	AK30	20mm	S
	CN120	18mm	S
	TR10	6mm	R
	OF5	24mm	S
	CTR30	6mm	R
	TIM85	6mm	R
	CAZ30	6mm	R
	AM10	6mm	R
	FA10	6mm	R
	CIP5	16mm	S
	C30	10mm	Sensibilité intermédiaire
	AZM15	19mm	S
	L2	6mm	R
	L15	6mm	R

	RIF5	6mm	R
	P10	6mm	R
	E15	6mm	R