

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Sciences Biologiques  
**Département :** Écologie et Génie de l'Environnement  
**Spécialité/Option :** Microbiologie appliquée

Intitulé

---

# Effet antibactérien d'une plante médicinale «*Rosmarinus officinalis*»

---

Présenté par

Melle : Hanine AMIROUCHE  
Melle : Salsabil BENLAMARI  
Melle : Manel BOULEBGHAL

Membre du jury

Dr. Lamia BENHALIMA  
Dr. Sandra AMRI  
Dr. Meriem Imen BOUSSADIA

Présidente  
Encadreur  
Examinatrice

Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma

2023

Nos remerciements vont en premier lieu aux membres du jury

Dr. Lamia BENHALIMA maitre de conférences « A » à l'université 8 Mai 1954, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury.

Dr. Meriem Imen Boussadia maitre de conférences « B » à l'université 8 Mai 1954, pour l'honneur qu'elle nous fait d'examiner ce modeste travail.

Dr. Sandra AMRI maitre de conférences « B » à l'université 8 Mai 1954, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Mille mercis ne suffisent pas pour exprimer nos grandes grâtes à nos parents qui n'ont jamais cessé de nous soutenir. Que ce travail soit le témoignage de notre profonde reconnaissance. Enfin, merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Table des matières

Remerciements	
Table des matières	
Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	10
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1.Historique.....	4
I.2. Noms vernaculaires .....	4
I.3. Caractéristiques botaniques de <i>Rosmarinus officinal</i> .....	4
I.4.Taxonomie .....	6
I.5. Répartition géographique.....	6
I.6. Utilisation du romarin.....	7
I.7. Activité antimicrobienne du romarin.....	7
I.8. Activité anti-inflammatoire du romarin .....	8
I.9. Activité anticancéreuse du romarin.....	8
I.10.Toxicité du romarin.....	8
I.11. Composition chimique du romarin .....	9
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
II.1. Matériel biologique .....	11
II.2.Extraction.....	11
II.3. Souches bactérienne .....	11
II.4. Milieux de culture.....	12
II.5. Tests phytochimiques .....	12
II.5.1. Préparation de l'infusé, du décocté et de l'extrait chloroformique.....	12
II.5.2. Tanins.....	12
II.5.3. Anthocyanes.....	12
I.5.4. Leucoanthocyanes .....	13
I.5.5. Flavonoïdes.....	13
II.5.6. Saponosides.....	13

II.5.7. Mucilages .....	13
II.5.8. Composés réducteurs .....	13
II.5.9. Alcaloïdes .....	13
II.5.10. Terpènes et stérols.....	14
II.5.11. Dérivés anthracéniques .....	14
II.6. Activité antibactérienne .....	14
II.6.1. Préparation d'extrait.....	14
II.6.2. Antibiogramme .....	14
II.6.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	15
II.6.4. Aromatogramme .....	15

### Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Rendement .....	17
III.2. Caractérisation phytochimique .....	17
III.3. Purification des souches bactériennes .....	21
III.4. Effet du chloramphénicol et du DMSO vis-à-vis des souches bactériennes .....	23
III.5. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque .....	23
III.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide .....	26
III.7. Aromatogramme.....	27
Conclusion et Perspectives.....	30
Références bibliographiques .....	32

## Résumé

Ce travail de master a pour objectif de déterminer le screening phytochimique et l'activité antibactérienne d'une plante médicinale *Rosmarinus officinalis* très abondante et utilisée pour ses divers effets thérapeutiques en Algérie. Dans cette étude, l'espèce *Rosmarinus officinalis* a été récoltée au niveau de la wilaya d'Annaba pour la préparation de l'extrait méthanoïque. Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*, de même les résultats révèlent la présence des anthocyanes, anthraquinones libres et anthraquinones combinées C-hétérosides, composés réducteurs, flavonoïdes, leucoanthocyanes, tanins de type galliques. Cependant, les alcaloïdes, les anthraquinones combinées O-hétérosides, tanins de type catéchiques et les mucilages n'étaient pas présents. L'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* a indiqué des zones d'inhibitions à partir de 240 mg d'extrait pour l'espèce *Escherichia coli* et de 160 mg pour l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Toutefois, aucune zone d'inhibition n'a été retrouvée pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Le calcul du rapport CMB/CMI a permis d'indiquer que l'extrait méthanoïque présentait un effet bactéricide vis à vis d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*. L'aromatogramme a indiqué que l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* est riche en composés volatils possédant une bonne activité antimicrobienne contre *Klebsiella pneumoniae*. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, nous supposons que l'intervalle de concentration choisit est largement inférieur à l'effet antibactérien.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, Souches bactériennes, Activité antibactérienne, Screening phytochimique, Antibiogramme, Aromatogramme.

## Abstract

This master work aims to determine the phytochemical screening and antibacterial activity of a medicinal plant *Rosmarinus officinalis* very abundant and used for its various therapeutic effects in Algeria. In this study, the species *Rosmarinus officinalis* was harvested in the wilaya of Annaba for the preparation of the methanoic extract. The Phytochemical screening allowed us to highlight the presence of secondary metabolites in the aerial part of *Rosmarinus officinalis*, and the results reveal the presence of anthocyanins, free anthraquinones and combined anthraquinones C-heterosides, reducing compounds, flavonoids, leucoanthocyanins, tannins of gallic type. However, alkaloids, combined anthraquinones O-heterosides, catechic type tannins and mucilage's were not present. The antibacterial activity of the methanoic extract of *Rosmarinus officinalis* indicated zones of inhibition from 240 mg of extract for *Escherichia coli* species and from 160 mg for *Klebsiella pneumoniae* species. However, no inhibition zone was found for *Pseudomonas aeruginosa* species. The calculation of the BMC/MIC ratio indicated that the methanoic extract presented a bactericidal effect against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The aromatogram indicated that the methanoic extract of *Rosmarinus officinalis* is rich in voltaic compounds with a good antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae*. For *Pseudomonas aeruginosa* species, it is assumed that the concentration range chosen is largely inferior to the antibacterial effect.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, Bacterial strains, Antibacterial activity, Phytochemical screening, Antibiogram, Aromatogram.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة سكرينينغ فيتوشيميك والنشاط المضاد للبكتيريا للنبنة الطبية *Rosmarinus officinalis* التي تستخدم على نطاق واسع في الطب البديل لتأثيراتها العلاجية المختلفة في الجزائر. في هذه الدراسة تم حصد النبنة من مدينة عنابة لكي يتم تحضير مستخلص ميثانويك. السكرينينغ الفيتوكيميائي للمستوى العلوي للنبنة اظهر وجود ميتابوليت ثانوية مثل انتو سيان، انتركينون حر وانتركينون مرتبط c ايتيروزيد مواد مرجعة، فلافونويد لوكواونتوسيان، تان غالنيك. لكن الالكالويد، والاونتوكينون-O-ايتيروزيد، تان كتيستيك والميسيلاج لم تكن موجودة. النشاط المضاد الحيوي للمستخلص الميثانول اظهر وجود مناطق تثبيت ابتداء من 240مغ من المستخلص للسلالة *Escherichia coli* 160مغ للسلالة *Klebsiella pneumoniae*. لم تظهر أي مناطق تثبيت بالنسبة للسلالة *Pseudomonas aeruginosa*. اظهر حساب النسبة CMB/CMI أن مستخلص الميثانويك هو بكتريسيد ضد *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae*. كذلك اظهر اروماتوغرام أن مستخلص الميثانويك ل *Rosmarinus officinalis* انه غني بالمكونات الطيارة وان لديه نشاط مضاد جيد ضد *Klebsiella pneumoniae* بالنسبة للسلالة *Pseudomonas aeruginosa* نظن أن نطاق التركيز المختار اقل بكثير من تأثير المضاد البكتيري.

**الكلمات المفتاحية:** *Rosmarinus officinalis*, السلالة البكتيرية، النشاط المضاد, سكرينينغ فيتوشيميك, انتيبيوغرام , اروماتوغرام.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	5
<b>Figure 2 :</b> Répartition géographique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	6
<b>Figure 3 :</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> ( <b>a</b> : partie aérienne, <b>b</b> : sous forme de poudre).....	11
<b>Figure 4 :</b> Aspect de l'extrait méthanoïque.....	17

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Caractérisation phytochimique de la partie aérienne de <i>Rosmariuns officinalis</i> . .	18
<b>Tableau 2</b> : Screening phytochimique de <i>Rosmariuns officinalis</i> .....	19
<b>Tableau 3</b> : Aspect des cellules bactériennes sur les milieux de cultures.....	22
<b>Tableau 4</b> : Effet du Chloramphénicol et du DMSO sur les souches bactériennes.....	23
<b>Tableau 5</b> : Diamètres des zones d'inhibition des souches bactérienne vis-à-vis de l'extrait méthanoïque.....	24
<b>Tableau 6</b> : Effet de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches bactériennes. ....	24
<b>Tableau 7</b> : Concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'extrait méthanoïque de <i>Rosmariuns officinalis</i> .....	27
<b>Tableau 8</b> : Activité intrinsèque des molécules bioactives.....	27
<b>Tableau 9</b> : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanoïque de <i>Rosmariuns officinalis</i> .....	28
<b>Tableau 10</b> : Aromatogramme de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches bactériennes. .....	28

# Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir des nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997). Selon l'organisation mondiale de la santé plus de 22000 espèces végétales ont été inventoriées comme plantes médicinales (Duraffourd *et al.*, 1997). Ces dernières ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir, ses métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques (Haddouchi *et al.*, 2009) expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les attaques microbiennes risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Bruneton, 1999). Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elle contient. Ces substances bioactives, synthétisées à partir de métabolites secondaires des plantes médicinales, suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, des biologistes et des médecins. Elles font partie de la pharmacie verte grâce à leurs propriétés biologiques prouvées : antimicrobienne, antioxydante, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérogène, anti-parasitaire, insecticide (Chaib, 2021).

Autour du bassin méditerranéen, l'usage des plantes médicinales occupait une place prépondérante aussi bien dans la vie quotidienne que lors des rituels dans les civilisations égyptienne, grecque et romaine (Bouzabata, 2015). L'Algérie avec sa diversité climatique et sa répartition géographique présente une flore de 3510 espèces (Mouas *et al.*, 2017). Notre choix est porté sur le *Rosmarinus officinalis*, c'est une plante très répandue en Algérie, cette espèce est considérée comme l'une des plus importantes flores locales du point de vue de sa diversité, son utilisation en médecine traditionnelle et ses propriétés thérapeutiques et anti-oxydantes (Quezel et Santa, 1962). De ce fait, il est apparu important de disposer d'une approche multidimensionnelle en ayant recours à une approche biologique intégrée qui a été sélectionnée à l'aide d'une combinaison de paramètres afin de mettre en place une étude assez complète. Nous avons donc choisi de focaliser nos efforts sur deux principaux objectifs, d'une part faire le screening phytochimique de *Rosmarinus officinalis* et d'autre part tester l'effet antibactérien vis-à-vis de 3 souches (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*) par la détermination de l'antibiogramme, la concentration minimale inhibitrice et bactéricide et l'aromatogramme.

Ce manuscrit comportera trois chapitres principaux :

- Le premier chapitre, sera consacré à la recherche bibliographique. Il comportera des généralités sur *Rosmarinus officinalis* ainsi que ses activités biologiques.
- Le second, est un chapitre expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'étude du screening phytochimique et de l'activité antibactérienne.
- Le troisième chapitre mentionnera les différents résultats obtenus et leur comparaison avec ceux de la littérature viendra enserrer ce chapitre.

Enfin ce manuscrit sera clôturé par une conclusion et des perspectives pour l'ensemble du travail.

# Synthèse Bibliographique

## I.1. Historique

L'utilisation du romarin est aussi ancienne que l'histoire humaine et date de 5000 avant notre ère. Sous la première dynastie pharaonique de l'Égypte ancienne, des branches de romarin étaient déposées dans les tombes des pharaons pour parfumer leur voyage dans l'au-delà. De plus, ils utilisaient des crèmes et des huiles à base de romarin pour se protéger des températures élevées et de la chaleur du désert (Borges *et al.*, 2019). Aussi en 220 av. J.-C. le romarin était introduit en Chine en référence à sa propriété de tonifier le corps fatigué. Il était utilisé comme précurseur des pharmacopées modernes, aussi le romarin était utilisé en aromathérapie pour parfumer les chambres et comme insecticide (González-Minero *et al.*, 2020).

Au moyen âge, ils étaient très sensibles aux vertus des plantes et ses propriétés médicinales (Gilly, 2005). En 1330, Ramon Llull obtient pour la première fois l'huile essentielle de romarin, qui sera utilisée dans les parfumeries (Borges *et al.*, 2019). Le romarin a eu d'autres apparitions remarquables à travers l'histoire. Lors de la grande peste de Londres de 1665 due à *Yersinia pestis*, les vapeurs de la plante étaient inhalées lors des déplacements dans les zones infectées. Pendant la seconde guerre mondiale, des mélanges de feuilles de romarin et de baies de genévrier ont été brûlés dans les hôpitaux français pour tuer les germes (González-Minero *et al.*, 2020). Enfin, il convient de noter que le romarin est aujourd'hui la plante la plus utilisée dans la médecine comme antispasmodique, diurétique, antiépileptique et antirhumatismal, ainsi que pour le diabète, la dysménorrhée, les maladies cardiaques et pour soulager les troubles respiratoires (González-Minero *et al.*, 2020).

## I.2. Noms vernaculaires

Le romarin tien son nom du latin rose de la mer, *ros* : rosée et *marinus* : de mer, allusion à son parfum et à son habitat sur les altitudes maritimes. Il a eu des noms scientifiques différents au cours des temps à savoir : Iklil al jabal, Klil, Hatssalouban, Hassalban, Lazir, Azîir, Ouzbir, Aklel, Touzala (Fedjer *et al.*, 2022).

## I.3. Caractéristiques botaniques de *Rosmarinus officinal*

*Rosmarinus officinal* plus connue sous le nom de romarin, c'est un arbuste persistant aromatique, atteignant une hauteur d'environ un mètre avec des tiges dressées, des feuilles vertes foncé (Fig.01) des fleurs bleues s'épanouissant tout au long de l'année attirent de nombreux insectes, des fruits est une baie ovale, sèche et lisse (Damerdji, 2012). Il a une saveur

aromatique intense et un goût amer et légèrement épicé, sa période de floraison a souvent lieu entre le mois de Mai et de Juin sous le climat méditerranéen, et la période de fructification a lieu entre le printemps et l'été (Borges *et al.*, 2019). L'appareil végétatif de la plante est composé de :

Les tiges possèdent une longueur de 0,5 à 2 mètre, ces tiges sont tortueuses, anguleuses et fragiles. L'écorce est linéaire à cyme plus ou moins simulant des épis (Sanon, 1992). Les tiges sont subcylindriques avec quatre bosses peu marquées, remplies de collenchyme qui apparaît sous un épiderme munies d'une épaisse cuticule jaune verdâtre et de nombreux poils (Hoefler, 1994). Les feuilles de longueur de 10 à 25 mm et de 1,5 mm de largeur, elles sont entièrement aciculaire, aiguilles verticillées par trois autour du rameau, la pointe est aiguë, cornée et très piquantes, la face supérieure avec deux bandelettes blanchâtres à des stomates nettement distinctes (Debazac, 1991). Les fleurs, c'est l'appareil reproducteur, groupées par trois ou quatre. Elles sont disposées vers le sommet des rameaux en courtes grappes formant un ensemble spiciforme. Elles ont des bractées lancéolées, velues, plus courtes qu'elles et caduques. Il comporte une lèvre inférieure à deux lobes lancéolés et une lèvre supérieure entière ovale. La corolle bilabée de 1,2 cm de large est tubuleuse de couleur bleu pâle. L'androcée est constitué de deux étamines saillantes avec des anthères allongées uniloculaires portant une seule fente (Leplat, 2017).



**Figure 1:** *Rosmarinus officinalis* (Photo prise le 21/03/2023 - Djebel Halouf, Guelma).

## I.4. Taxonomie

D'après [Akshay et al. \(2019\)](#), la classification systématique de *Rosmarinus officinalis* est comme suit :

**Royaume :** *Plantae*

**Division :** *Trachéophyte*

**Sous-division :** *Spremathophytina*

**Classe :** *Magnoliopsida*

**Sous-classe :** *Asteridae*

**Ordre :** *Lamiales*

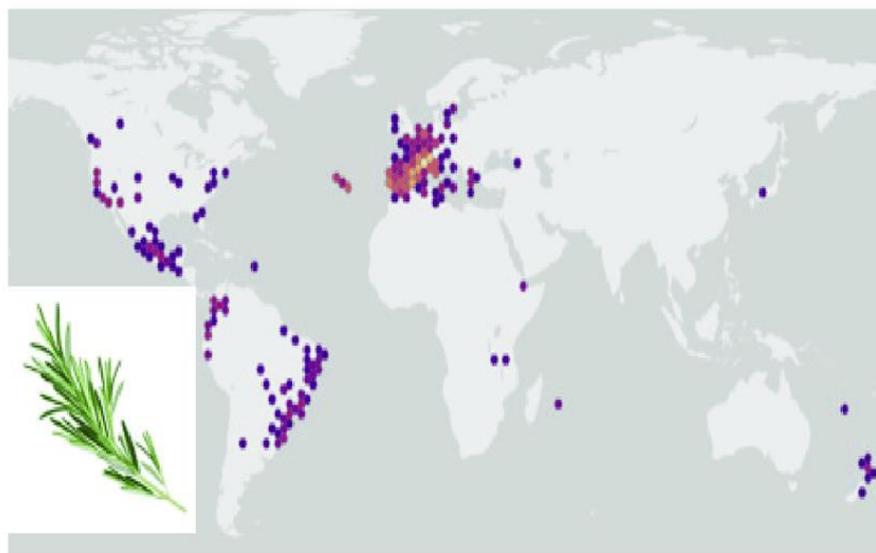
**Famille :** *Lamiacées*

**Genre :** *Rosmarinus*

**Espèce :** *Rosmarinus officinalis*

## I.5. Répartition géographique

Etant donné qu'il est cultivé depuis l'antiquité, on le retrouve dans de nombreux pays (**Fig.02**) d'Europe et d'Asie notamment l'Inde et le Philippines, l'Australie, les Etats-Unis, le Mexique l'Afrique du nord et au sud de l'Espagne ou il est considéré comme endémique ([Josée et Minero, 2020](#)).



**Figure 2 :** Répartition géographique de *Rosmarinus officinalis* ([Josée et Minero, 2020](#)).

*Rosmarinus officinalis* 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).

## I.6. Utilisation du romarin

Il est rapporté que le romarin est utilisé dans la médecine traditionnelle et moderne pour le traitement de diverses maladies et affections comme antispasmodique, colique néphrétique, antirhumatismal, diurétique, antiépileptique, expectorant, contre le diabète, la dysménorrhée, les maladies cardiaques et pour soulager les troubles respiratoires, ...etc. Il a également été utilisé à des fins analgésiques contre les douleurs abdominales, les maux d'estomac et les maux de gorge. De plus, il a été utilisé comme tonique pour améliorer le dysfonctionnement de la mémoire, en particulier lors de travaux physiques ou mentaux excessifs. De plus, la plante est connue pour être utilisée comme insecticide et herbicide parmi de nombreuses autres utilisations signalées (Karadag *et al.*, 2019). En gastronomie, le romarin est très utilisé en tant que condiment dans le bassin méditerranéen et en Angleterre pour aromatiser les viandes, les poissons et les légumes. Il existe du miel spécialement produit à partir du nectar des fleurs de romarin. Ce miel très parfumé est appelé miel de romarin. Son goût aromatique lui permet de prendre la place de la vanille pour agrémenter les gâteaux (Fedjer *et al.*, 2022). En cosmétique, l'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients des produits de beauté, de savons. De plus, il accélère la pousse des cheveux, son huile essentielle entre dans la composition de nombreux parfums (Arnold *et al.*, 1997).

## I.7. Activité antimicrobienne du romarin

Il a été rapporté que certains composés de l'extrait de romarin ont des propriétés antimicrobiennes. Les activités antibactériennes et antifongiques de l'huile et de l'extrait de romarin ont été mises en évidence *in vitro*, contre un large spectre de bactéries à Gram négatif et positif tels que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila* et *Salmonella choleraesuis*. Les composés responsables de cette activité sont des diterpènes phénoliques, le carnosol et l'acide carnosique, l' $\alpha$ -pinène, l'acétate de bornyl, le camphore et le 1,8-cineole. Le mécanisme par lequel ces molécules inhibent les bactéries, consiste à affecter le fonctionnement et la composition de la membrane cellulaire, la synthèse de l'ADN, de l'ARN,

des protéines et des lipides (Akshay *et al.*, 2019). De plus, il a été démontré que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* inhibe l'adhésion de *Candida albicans* en dénaturant les structures cellulaires et en modifiant la perméabilité membranaire. Selon une étude, le romarin peut même empêcher le développement de biofilms fongiques très résistants, inhiber la croissance et la production d'aflatoxines de nombreux champignons et il peut être utilisé comme conservateur alimentaire efficace (Hamidpour *et al.*, 2017).

### **I.8. Activité anti-inflammatoire du romarin**

Le romarin a présenté de puissants mécanismes anti-inflammatoires, l'huile essentielle et l'extrait de romarin se sont révélés inhiber de manière significative la migration des leucocytes *in vivo*. Il peut réduire le nombre de leucocytes au site de l'inflammation, entraînant une réponse anti-inflammatoire. L'extrait de romarin a également inhibé d'autres substances pro-inflammatoires telles que l'oxyde nitrique et les gènes associés à l'inflammation. L'activité anti-inflammatoire du romarin dépend très probablement d'un mécanisme synergique entre plusieurs de ses composants (Akshay *et al.*, 2019).

### **I.9. Activité anticancéreuse du romarin**

De nombreuses études ont rendu compte des mécanismes anti-cancéreux de romarin, ils ont démontré des activités antiprolifératives significatives contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines. Aussi, il a été démontré que les principaux composés de l'extrait de romarin induisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Cette activité peut éventuellement être utilisée dans de futurs traitements contre le cancer et justifient des recherches plus approfondies (Hamidpour *et al.*, 2017).

### **I.10. Toxicité du romarin**

Le romarin peut s'avérer extrêmement toxique à certaines doses non recommandées. Son utilisation est déconseillée au cours de la grossesse et durant l'allaitement. Il est également déconseillé pour les personnes atteintes d'hypertension, d'insomnie ou d'épilepsie. Il peut provoquer certaines réactions allergiques, telles que l'irritation de la peau, les irritations stomacales et intestinales (Meziane, 2014). L'huile essentielle de romarin peut déclencher des convulsions et des crises d'épilepsie (Harrane, 2012).

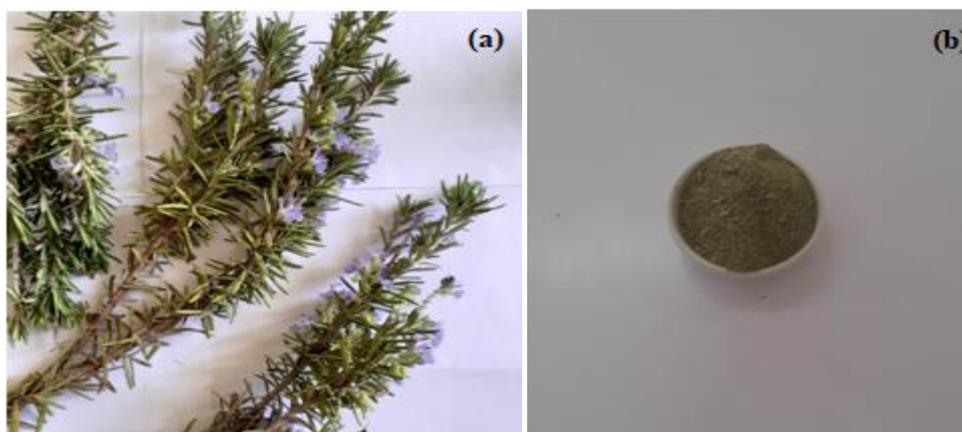
### **I.11. Composition chimique du romarin**

Le romarin contient plusieurs agents actifs parmi lesquels les huiles essentielles, les flavonoïdes, diterpènes, triterpènes et stéroïdes, tanins, lipides, rosmaricine, acide rosmarinique (Harrane, 2012). Les phénols diterpinéques constitués principalement d'acide carnosolique qui se dégrade facilement en carnosol, et est accompagné d'isorosmanol, de rosmariquinone, de rosmaridiphénol. Les dérivés de l'acide cinnamique représentent environ 3,5 % et sont constitués principalement d'acide rosmarinique de 1,1 à 2,5 % (Ghedira, 2005).

# Matériel et Méthodes

## II.1. Matériel biologique

La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* (**Fig.03 a**) a été récoltée au niveau des montagnes de Seraidi (Wilaya d'Annaba), le 09 Septembre 2022. L'échantillon a été lavé à l'eau courante, puis séché à l'ombre et à l'abri de la lumière à température ambiante. Après séchage, la partie aérienne a été broyée pour obtenir une poudre fine (**Fig.04 b**), qui a servi pour la préparation de l'extrait.



**Figure 3 :** *Rosmarinus officinalis* (**a** : partie aérienne, **b** : sous forme de poudre).

## II.2.Extraction

Le travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'université 08 Mai 1945 Guelma. La poudre fine de la plante séchée a été macérée dans une solution hydro-alcoolique (méthanol/eau : 8/2 : v/v) pendant 24 heures. Après macération, la solution a été filtrée et concentrée sous vide à 45 °C au évaporateur rotatif puis conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés à 4 °C.

## II.3. Souches bactérienne

Les germes utilisés sont des souches de références de type ATCC (American Type Culture Collection), ils constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles ou de synthèses. Les souches utilisées ont été fournies par l'hôpital de Guelma et par Dr. Lamia Benhalima et Meriem Imen Boussadia (Maître de conférence à l'université 8 Mai 1954 Guelma). Les souches utilisées sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pour des raisons inexplicables et malgré plusieurs essais, l'espèce *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 n'a pas pu être purifiée, ni cultivée. Pour cela, Dr. Benhalima, nous a fourni l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, cette espèce a été isolée à partir des eaux usées.

## II.4. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées et les souches étudiées, nous avons utilisé plusieurs milieux tels que la gélose nutritive, Hektoen, Chapman, Cétrimide, gélose et bouillon Muller Hinton et du bouillon nutritif.

## II.5. Tests phytochimiques

Le screening des différentes classes de métabolites secondaires a été réalisé selon les méthodes colorimétriques décrites par Edeogal *et al.* (2005) et Karumi *et al.* (2004). La présence de métabolites secondaires a été déterminée par des réactions de précipitation, de turbidité ou de changement de couleur.

### II.5.1. Préparation de l'infusé, du décocté et de l'extrait chloroformique

Pour la préparation de l'infusé à 10 %, nous avons placé 10 g de la plante en poudre dans 100 ml d'eau bouillante, après 15 min on procède à la filtration et à la récupération de l'infusé puis compléter à 100 ml. Pour le décocté, nous avons rajouté à 2 g de la plante en poudre 100 ml d'eau, porté à l'ébullition pendant 30 minutes, après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. Pour l'extrait chloroformique, nous avons rajouté à 1 g de la plante en poudre 10 ml de chloroforme, puis chauffé pendant 3 minutes au bain-marie, ensuite filtrer à chaud et complété à 10 ml.

### II.5.2. Tanins

Dans un tube à essais, nous avons pris 5 ml de l'infusé auquel nous avons ajouté goutte à goutte 1 ml d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1 %. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques et celle en bleue noirâtre indique la présence de tanins galliques.

### II.5.3. Anthocyanes

Diviser l'infusé à 10 % sur 3 tubes, le 1<sup>er</sup> tube de l'infusé sera considéré comme le témoin, nous avons rajouté au 2<sup>ème</sup> tube de l'infusé quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) à 37 %, ensuite, nous avons rajouté quelques gouttes d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) au 3<sup>ème</sup> tube de l'infusé. La recherche des anthocyanes est basé sur le changement de la couleur de l'infusé avec le changement du pH.

#### **I.5.4. Leucoanthocyanes**

Nous avons mélangé 5 ml de l'infusé à 10 % avec 4 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol /HCl à 37 % - 3V/V). Après un chauffage au bain marie à 50 °C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leucoanthocyanes.

#### **I.5.5. Flavonoïdes**

Dans un tube à essais, nous avons induit 5 ml d'infusé, puis rajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré a parties égales en volume), 1 ml d'alcool isoamylique puis quelque copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de crépitation pendant quelque minute. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageant indique la présence d'un flavonoïde.

#### **II.5.6. Saponosides**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml du décocté, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 10 min et la teneur en saponosides est évaluée (pas de mousse = test négatif, mousse moins de 1cm = test faiblement positif, mousse de 1-2 cm = test positif, mousse plus de 2 cm = test très positif).

#### **II.5.7. Mucilages**

Nous avons introduire 1 ml du décocté dans un tube à essai et rajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilage.

#### **II.5.8. Composés réducteurs**

La détection des composés réducteurs consiste à mélanger 1 ml du décocté avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

#### **II.5.9. Alcaloïdes**

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 heures de 5 g de la poudre dans 25 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 10 % à température ambiante. Après filtration sur un papier Whatman. Introduire 1 ml du filtrat dans un tube à essai, puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été rajoutées. La présence d'une turbidité ou d'un précipité blanc jaunâtre, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

### II.5.10. Terpènes et stérols

Nous avons procédé à une macération de 5 g de la poudre dans 20 ml d'éther de pétrole. Après filtration et évaporation la phase organique dans un bain de sable à 90 °C, le résidu est dissout dans 5 ml d'acide acétique en ajoutant 1 ml d'acide sulfurique concentré. Dans la zone de contact, entre les deux liquides ils se forment un cercle marron ou violet qui vire vert le gris, ce changement indique la présence de stérol et de terpène.

### II.5.11. Dérivés anthracéniques

Pour les anthraquinones libres, mélanger 1 ml de l'extrait chloroformique avec 1 ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) dilué (V/V : 1/1) puis agité. Une coloration plus et moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres. Pour les anthraquinones combinées, à partir de l'extrait chloroformique, nous avons préparé un hydrolysats auquel il a été ajouté 10 ml d'eau, 1 ml d'HCl concentré puis maintenir le tube à essai au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Filtrer, puis récupérer 5 ml de l'hydrolysats et faire agiter avec 5 ml de chloroforme, récupérer la phase organique puis rajouter 1 ml de NH<sub>4</sub>OH (dilué à ½) et agiter. La présence d'anthraquinones est révélée par l'apparition d'une coloration rouge plus ou moins foncée. La réaction peut être plus poussée par addition à 5 ml de l'hydrolysats 3 à 4 gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10 % puis agitation avec 5 ml de chloroforme. En présence d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de anthraquinones combinées de type O- hétérosides.

Nous avons repris la phase chloroformique par 10 ml d'eau et 1 ml de FeCl<sub>3</sub> à 10 %. Après ébullition au bain-marie pendant 30 min, nous avons rajouté à la phase chloroformique 5 ml de chloroforme et 1 ml de NH<sub>4</sub>OH (dilué à 1/2). Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des anthraquinones combinées de type C-hétérosides.

## II.6. Activité antibactérienne

### II.6.1. Préparation d'extrait

L'extrait méthanoïque préparés au paravent est repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2 % à raison de 1 g/ml.

### II.6.2. Antibiogramme

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite par [Bauer et al. \(1966\)](#). A partir de colonies jeunes de 18 à 24 heures, une suspension bactérienne est réalisée dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 % de NaCl est préparée pour chaque souche bactérienne. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée (1/100) afin d'obtenir un inoculum de 10<sup>6</sup> bactéries/ml. Cet

inoculum est étalé à l'aide d'un écouvillon sur boîtes Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton. L'extrait est déposé à 160, 240 et 400 mg dans des puits. Les boîtes Pétri sont d'abord laissées pendant 2 heures à 4 °C avant d'être incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures. L'évaluation de l'inhibition est réalisée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits. Nous avons utilisé un témoin négatif (DMSO à 2 %) et un témoin positif (chlorophénicol 30 µg).

### **II.6.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) a été réalisée selon la méthode décrite par [Bolou \*et al.\* \(2010\)](#). La CMI est préparée selon la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile allant de 0 à 1 g/ml a été préparée, on prépare également pour chaque souche bactérienne un inoculum de  $10^6$  bactéries /ml dans du bouillon Mueller-Hinton. Ensuite on rajoute dans un tube, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien, les tubes sont mélangés puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, on examine la croissance bactérienne dans chaque tube qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible. Pour déterminer la CMB, on réalise 24 heures plus tôt, un témoin bactéricide en ensemençant par stries une gélose nutritive en boîte Pétri, la solution mère et les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  de l'inoculum de départ correspondant respectivement à 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % et 0,01 % de survivants. Après la lecture de la CMI on effectue des repiquages en stries en gélose nutritive des tubes sans croissance visible. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures, après on compare les stries au témoin bactéricide. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montrant une croissance de germe inférieure ou égale à 0,01 % de survivants.

### **II.6.4. Aromatogramme**

L'aromatogramme a été réalisée selon la méthode décrite par [Joffin et Leyral \(2006\)](#). Cette méthode au même principe que l'antibiogramme, sauf que l'extrait a été posée sur des disques de papier Whatman de 10 mm de diamètre sur le couvercle. L'activité de molécules actives sera évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition qui se forme sur les boîtes Pétri. La quantité d'extrait déposer sur chaque disque de papier Whatman est de 400 mg.

# Résultats et Discussion

### III.1. Rendement

L'extrait méthanoïque a été caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport à la poudre sèche de *Rosmarinus officinalis*. En matière de rendement, l'extrait méthanoïque a présenté un rendement en extrait assez faible de l'ordre de 4,124 % par rapport au 250 g de poudre. Pour l'aspect et la couleur, il a été de couleur verte très foncée, de forme granuleuse non visqueuse incohérente et huileuse de forte odeur (**Fig.04**). En comparant nos résultats avec d'autres travaux sur la même espèce, nos résultats indiquent un rendement supérieur à celui rapporté par [Boutabia et al. \(2016\)](#) et [Djousse et al. \(2022\)](#) qui ont indiqué des rendements de l'ordre de 1,60 et 0,98 % respectivement. Cette différence pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et de qualité. Le rendement peut varier selon le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe utilisée, le degré de fraîcheur, la période de séchage et la méthode d'extraction employée. De plus, cette différence peut s'expliquer par la quantité des composés extractibles qui est inversement proportionnel à la polarité décroissante du solvant utilisé ([Belhaoues et al., 2020](#)).



**Figure 4 :** Aspect de l'extrait méthanoïque.

### III.2. Caractérisation phytochimique

Les résultats de l'étude phytochimique effectuée sur la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* sont reportés dans le **Tableau 01 et 02**.

**Tableau 1** : Caractérisation phytochimique de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*.

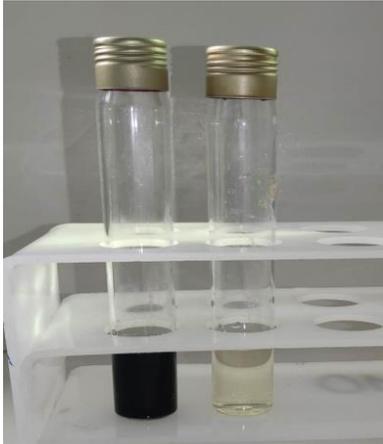
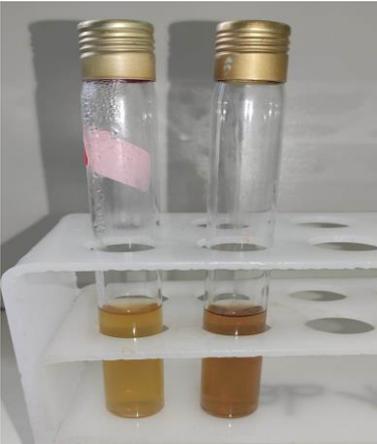
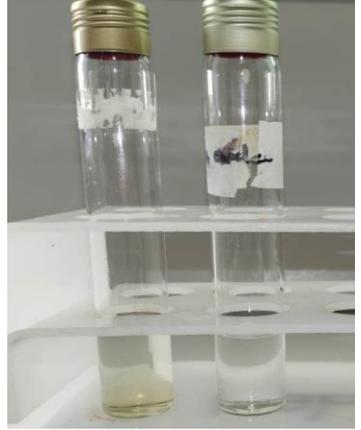
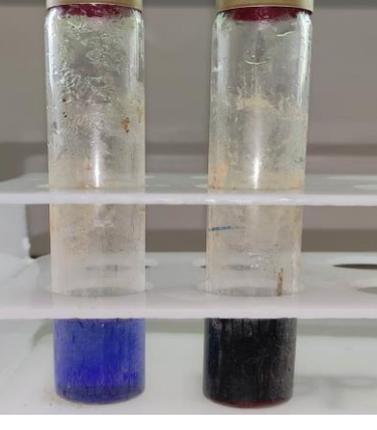
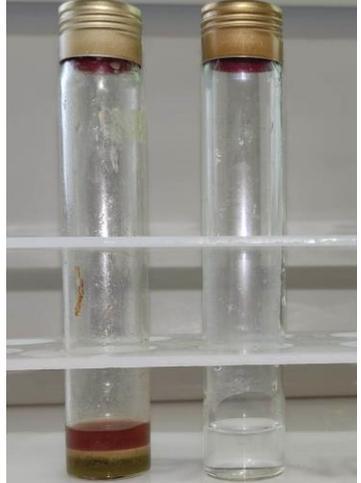
Molécules détectés		Résultat
<b>Anthocyanes</b>		++
<b>Alcaloïdes</b>		-
<b>Anthraquinones libres</b>		++
<b>Anthraquinones combinées</b>	O-hétérosides	-
	C-hétérosides	++
<b>Composés réducteurs</b>		+
Flavonoïdes	Flavones	+
	Flavanones	-
	Flavanonols	-
<b>Leucoanthocyanes</b>		+
<b>Mucilages</b>		-
<b>Tanins</b>	catéchiques	-
	galliques	+++
<b>Saponosides</b>		+

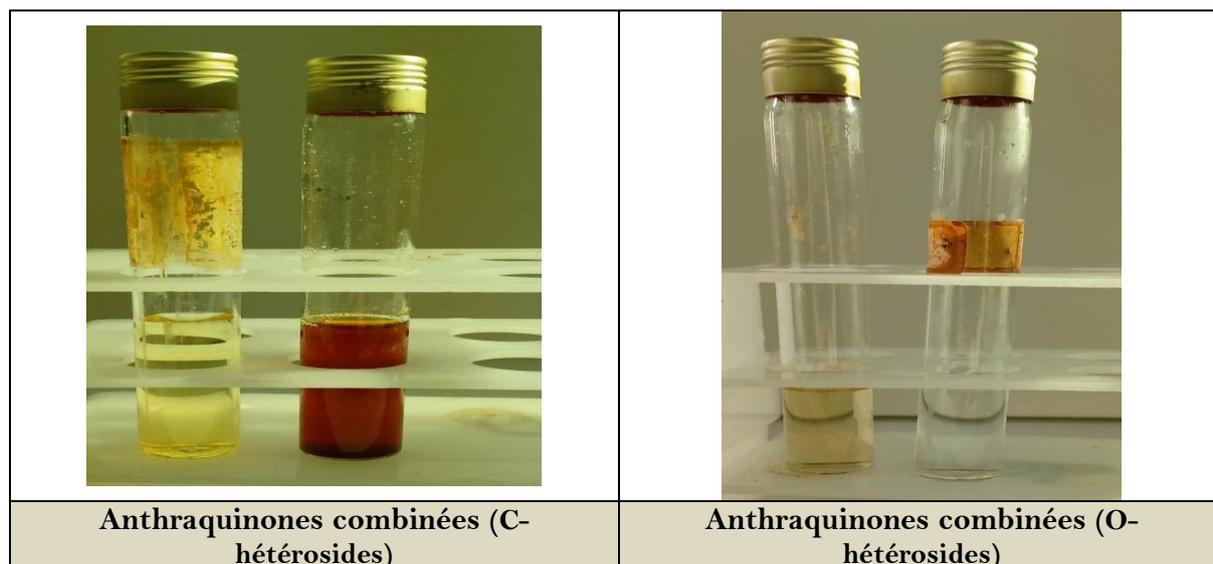
(+) : Présence  
(-) : Absence

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau de la plante *Rosmarinus officinalis*. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité ou un virage de couleur. Les résultats révèlent la présence des anthocyanes, anthraquinones libres et anthraquinones combinées de type C-hétérosides, composés réducteurs, flavonoïdes, leucoanthocyanes, tanins de type galliques. Toute fois, les alcaloïdes, anthraquinones combinées de type O-hétérosides, tanins de type catéchiques et les mucilages n'étaient pas présents.

Les flavonoïdes jouent des rôles très importants dans les plantes, elles protègent les plantes contre le stress hydrique et génère une tolérance des plantes aux métaux lourds présente dans les sols. Hors les plantes, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques. Ils sont les promoteurs dans les traitements des troubles veineux et capillaires. Aussi, ils protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti-radicalaire (Makhloufi, 2013). En effet, les flavonoïdes possèdent des effets thérapeutiques contre plusieurs maladies tell que la toux, la grippe, la fièvre, l'asthme, l'hypertension et les intoxications (Daira *et al.*, 2016). Nos résultats ont indiqué la présence des flavonoides de type flavones, les travaux de Gonzalez-Trujano *et al.* (2007) ; Makhloufi (2013) ; Fadili *et al.* (2015) et Edrah *et al.* (2017) ont indiqué aussi la présence de flavonoïdes chez *Rosmarinus officinalis*.

Tableau 2 : Screening phytochimique de *Rosmarinus officinalis*.

		
<p><b>Tanins Galliques</b></p>	<p><b>Anthocyanes</b></p>	<p><b>Leucoanthocyanes</b></p>
		
<p><b>Saponosides</b></p>	<p><b>Mucilages</b></p>	<p><b>Composés réducteurs</b></p>
		
<p><b>Alcaloïdes</b></p>	<p><b>Anthraquinones libres</b></p>	<p><b>Flavonoïdes</b></p>



Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé (Loto *et al.*, 2011) dans notre étude nous avons retrouvé la présence des tanins galliques et l'absence des tanins catéchiques. Ces substances ont des propriétés de liaison aux protéines, ce qui explique leurs capacités de bronzage. Elles aident à arrêter les saignements et à combattre les infections. Les plantes riches en tanin sont utilisées pour assouplir les tissus dans les traitements des varices et réparer les tissus endommagés par l'eczéma ou les brûlures (Loto *et al.*, 2011). De plus, Iserin (2001) ont démontré que les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ils ont un rôle antioxydant (Makhloufi, 2013). Nos résultats ont indiqué la présence de tanins chez *Rosmarinus officinalis*, cela a été aussi signalé par les travaux de Johar *et al.* (2015) et Gonzalez-Trujano *et al.* (2007).

Les plantes sont très riches en saponosides, ces molécules ont des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse, ce qui justifie leur utilisation dans les traitements traditionnels pour l'insuffisance veineuse, des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire et des troubles de la fragilité capillaire (Roux et Catier, 2007). Les résultats obtenus ont révélé l'émergence d'une mousse de 1,3 cm de haut, confirmant la présence de saponine. Nos résultats sont cohérents avec les travaux de Makhloufi (2013) ; Fadili *et al.* (2015) ; Johar *et al.* (2015) ; Karouche *et al.* (2021) qui ont indiqué que *Rosmarinus officinalis* est riche en ce métabolite.

Les anthocyanes sont des substances aux propriétés vitaminiques, elles réduisent la perméabilité et augmentent la résistance capillaire. Elles sont recommandées pour le traitement de certaines maladies vasculaires, fragilité capillaire, insuffisance veineuse et symptômes hémorroïdaires. Selon Richard (2012) et Zemmouri (2015), les anthocyanes sont

présents dans presque toutes les angiospermes. Il constitue un groupe de pigments solubles dans l'eau et l'alcool et donnent des couleurs aux fruits et légumes. Ce sont de puissants antioxydants (Daira *et al.*, 2016). Ils sont responsables de la coloration vive, allant du rouge au violet en passant par le bleu.

Les anthraquinones ont un effet stimulant et laxatif sur le gros intestin, provoquant une contraction de la paroi intestinale, simulant la vidange et facilitant ainsi le transit intestinal, ce qui explique les effets stomachaux du romarin (Daira *et al.*, 2016). Nos résultats ont démontré que ce composé est abondant chez *Rosmarinus officinalis*. Cela a déjà été démontré par les travaux de Makhloufi (2013) ; Fadili *et al.* (2015).

Les mucilages sont des polysaccharides hétérogènes qui ont la propriété de gonfler au contact de l'eau, ce qui donne une substance semblable à un gel ou une solution colloïdale. Ils sont composés de sucres et d'acides uroniques (Karumi *et al.*, 2004). Les alcaloïdes occupent une place très importante parmi les métabolites secondaires, ils sont connus pour ces vertus thérapeutiques avérées, certains alcaloïdes sont antimicrobiens (Daira *et al.*, 2016), D'après N'Guessan *et al.* (2009), les alcaloïdes ont des activités anti-convulsivantes, antirhumatismales, analgésiques et anticancéreuses. Leur effet laxatif a également été révélé par Iserin (2001). L'absence des alcaloïdes chez *Rosmarinus officinalis* a aussi été signalée par Makhloufi (2013) et Fadili *et al.* (2015). Toute fois, Edrah *et al.* (2017) et Karouche *et al.* (2021) ont indiqué la présence de ce métabolite chez *Rosmarinus officinalis*. Cela la peut-être dû aux facteurs climatique et la nature du sol.

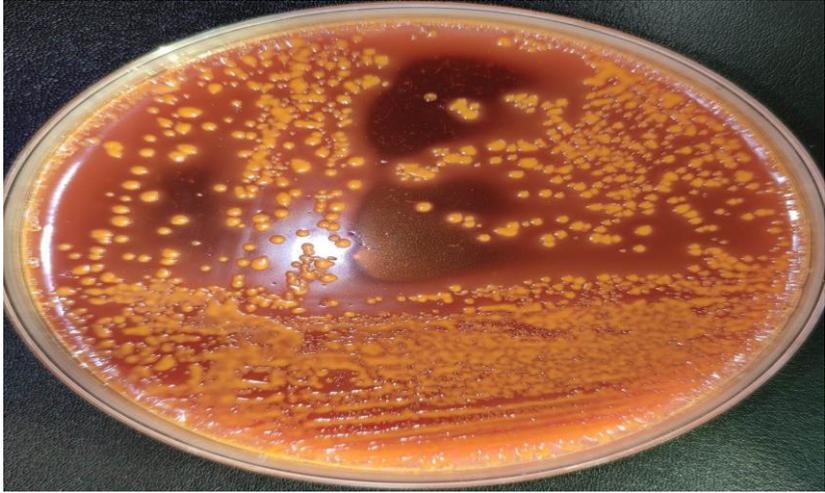
Les composés réducteurs sont représentés par un type d'ose possédant un groupe d'aldéhyde ou capable d'en former un par isomérisation. On compte parmi les oses réducteurs le glucose, le glycéraldéhyde et le galactose. Beaucoup de disaccharides, tels que le lactose et le maltose. Nos résultats ont indiqué la présence des composés réducteurs chez *Rosmarinus officinalis*. Cela a aussi été observé par Makhloufi (2013). Il expliquait que la teneur en composés réducteurs du romarin pourrait être responsable de l'effet antioxydant élevé de la plante.

### III.3. Purification des souches bactériennes

Afin de vérifier leur pureté, les souches bactériennes ont été ensemencées et repiquées sur des milieux de cultures spécifiques, les photos présentées sont représentées dans le **tableau 03**. Sur la gélose Hektoen, l'espèce *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* se présente sous forme

de petites colonies de couleur saumon. Sur la gélose Cétrimide, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* se présente sous forme de petites colonies lisses muqueuses de couleur bleu-vert.

**Tableau 3** : Aspect des cellules bactériennes sur les milieux de cultures.

<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

### III.4. Effet du chloramphénicol et du DMSO vis-à-vis des souches bactériennes

Afin de soumettre l'extrait aux essais biologiques, la résistance ou la sensibilité bactérienne peut également être critique. Pour cela, le chloramphénicol a été testé comme témoin positif. Les résultats obtenus indiquent que les souches bactériennes peuvent présenter des zones d'inhibitions au chloramphénicol (**Tableau 04**).

De même, la toxicité du solvant peut être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher les procédés biologiques (Yrjöen, 2004), pour cela le DMSO à 2 % a été testé, le résultat obtenu ont indiqué que le DMSO à 2 % est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches bactériennes (**Tableau 04**).

**Tableau 4** : Effet du Chloramphénicol et du DMSO sur les souches bactériennes (moyenne  $\pm$  écart type).

	Chloramphénicol (30 $\mu$ g)	DMSO à 2 %
<i>Escherichia coli</i>	30 $\pm$ 00 mm	00,00 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25 $\pm$ 00 mm	00,00 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30 $\pm$ 00 mm	00,00 mm

### III.5. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque

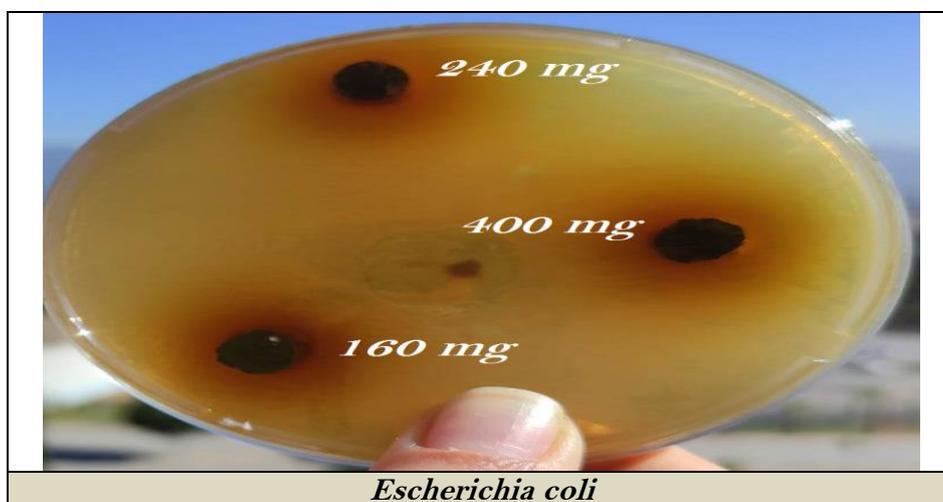
Nous avons étudié *in vitro* l'activité antibactérien de l'extrait méthanoïque de plante *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'activité antibactérienne de notre extrait a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition au tour des puits contenant l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis*. Les résultats obtenus à partir de cet extrait sont représentées dans le **tableau 05** et les photos présent dans le **tableau 06**. D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* peut avoir un effet antibactérien sur les espèces bactériennes étudiées. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* a indiqué des zones d'inhibitions à partir de 160 mg. L'espèce *Escherichia coli* a indiqué des zones d'inhibitions de l'ordre de 12,33  $\pm$  01,53 mm et 24,67  $\pm$  04,17 mm pour des quantités de 240 mg et 400 mg d'extrait méthanoïque. Toute fois, aucune zone d'inhibition n'a été retrouvée pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

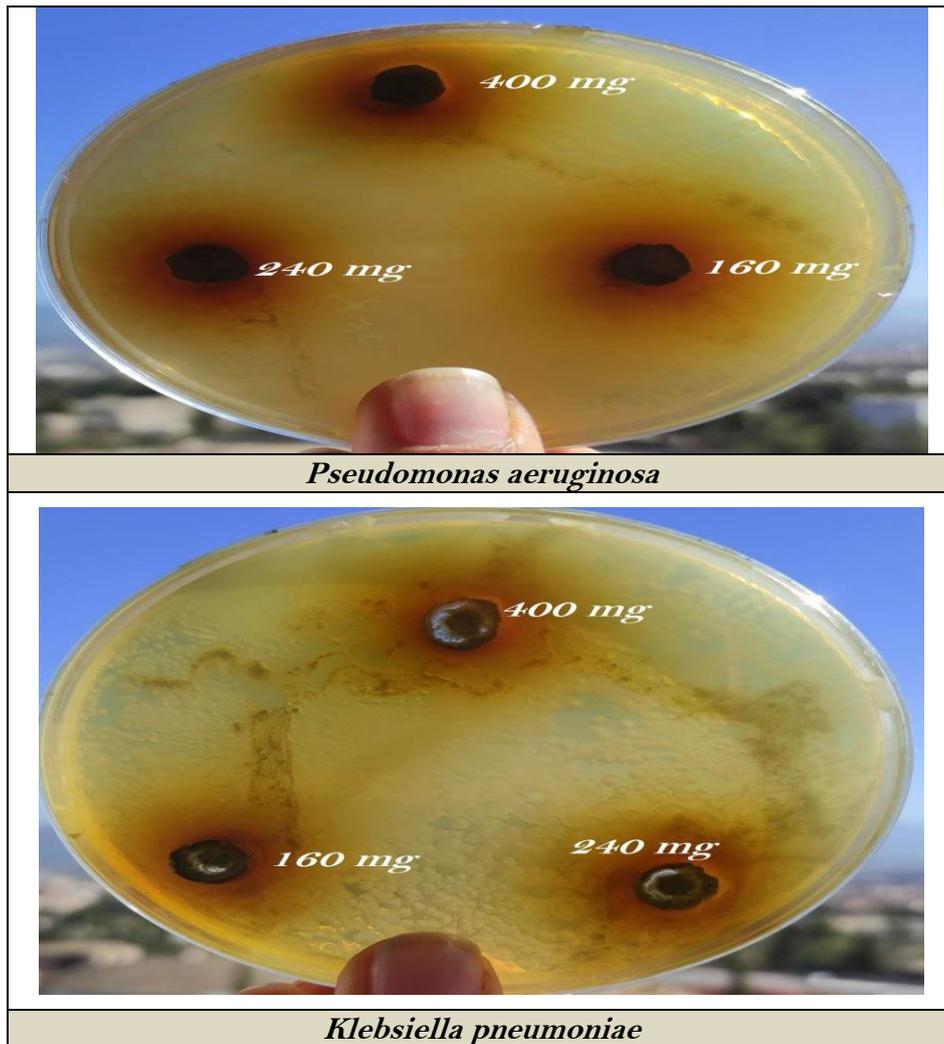
**Tableau 5 :** Diamètres des zones d'inhibition des souches bactérienne vis-à-vis de l'extrait méthanoïque (Moyenne  $\pm$  écart type).

Souches bactériennes	Zones d'inhibitions (mm)		
	160 mg	240 mg	400 mg
<i>Escherichia coli</i>	00 $\pm$ 00	12,33 $\pm$ 01,53	24,67 $\pm$ 04,17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,67 $\pm$ 01,53	13,00 $\pm$ 01,00	17,67 $\pm$ 03,21

Les résultats obtenus ont indiqué que l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* possède un effet antibactérien. Cela a été aussi observé par les travaux de [Genena et al. \(2008\)](#), qui ont indiqué que le romarin a un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries à Gram négatives. Toutefois les travaux de [Karouche et al. \(2021\)](#), ont indiqué des zones d'inhibitions pour l'espèce *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, aucune zone d'inhibition n'a été retrouvée pour l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis*.

**Tableau 6 :** Effet de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches bactériennes.





Les travaux de [Seddik et al. \(2011\)](#) ont indiqué que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* est inactif sur les souches bactériennes à Gram négatifs comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre l'étude menée par [Weckesser et al. \(2007\)](#) a indiqué que les extraits de romarin présentait principalement une activité contre les bactéries à Gram positive comme *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. De même, les travaux de [Makhloufi \(2013\)](#) ont indiqué que l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* présentait des zones d'inhibitions de l'ordre de 34 mm pour des concentrations de 500 mg/ml chez *Escherichia coli*. Par contre, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* ont indiqué une zone d'inhibition de l'ordre de 16,5 mm pour la même concentration.

Les résultats obtenus dans notre étude diffèrent de ceux des autres recherches, plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence, notamment le processus de séchage de l'extrait, la résistance bactérienne et la concentration des molécules bioactives trop faibles. Ainsi que la susceptibilité des bactéries qui est en effet indépendante du Gram ([Dorman et](#)

(Deans, 2000), et dépendante de la nature de l'extrait utilisées (Deans et Ritchie, 1987). Les mécanismes antibactériens de *Rosmarinus officinalis* peut être du aux composés actifs présent dans la plante dont leur activité pourrait être due à leur capacité à se combiner avec la paroi bactérienne (Cowan, 1999). Les travaux d'Abedini (2013) ont démontré que les flavonoïdes possédaient des activités antifongiques et antibactériennes qui contrôlaient la croissance et le développement des cellules bactériennes. De même, les tanins possèdent une forte activité antioxydante, ce sont de très bons pièges à radicaux libres et ils inhibent la formation de radicaux superoxydes. De plus, ils possèdent des propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et de dermatites (Richard, 2012 ; Daira *et al.*, 2016). De même, les saponosides et les anthocyanes possèdent plusieurs propriétés biologiques et pharmacologique, comme antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Richard, 2012 ; Laouini, 2014).

Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace, riche en lipopolysaccharide dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes. Toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable. Autrement dit, les composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries à Gram négatif en induisant sa perméabilité et la mort cellulaire (Ouibrahim, 2015).

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de composés, cela est dû à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et sécréter des agrégats structurés appelés biofilms. Ces derniers forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peuvent dégrader les huiles essentielles. Cette espèce est un danger pour la santé publique en raison de sa croissance rapide, plasticité de son génome et sa résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (Benhalima, 2016).

### III.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide (CMB) de l'extrait étudié vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella pneumoniae* sont mentionnées dans le **tableau 07**. L'activité minimale inhibitrice de l'extrait méthanoïque a été révélée à une concentration de 160 mg/ml pour *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

L'activité minimale bactéricide la plus faible est notée pour *Klebsiella pneumoniae* avec une valeur de 240 mg/ml. Cependant, l'espèce *Escherichia coli* a présenté une CMB de l'ordre de 400 mg/ml. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, nous n'avons pas pu déterminer la CMI et de la CMB.

**Tableau 7 :** Concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'extrait méthanoïque de *Rosmariuns officinalis*.

Souches bactérienne	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	Rapport CMB/CMI
<i>Escherichia coli</i>	160	400	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	160	240	1,5

Le calcul du rapport CMB/CMI a indiqué des valeurs de 1,5 et 2,5 pour l'espèce *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* respectivement. La comparaison de ce rapport avec la grille de classification de l'activité intrinsèque des molécules bioactives (**tableau 08**) proposée par [Marmonier \(1990\)](#), a permis d'indiquer que cet extrait présentait un effet bactéricide vis à vis d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*. Malheureusement, il était impossible de comparer nos résultats avec la bibliographie, car très peu de travaux sur le rapport CMB/CMI de la plante *Rosmariuns officinalis* ont été réalisés. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, on suppose que les valeurs de la CMI et de la CMB sont largement supérieures à l'intervalle de concentration choisit.

**Tableau 8 :** Activité intrinsèque des molécules bioactives ([Marmonier, 1990](#)).

CMB/CMI	Activité intrinsèque
<b>Inferieur 4</b>	Effet bactéricide
<b>Comprise entre 8-16</b>	Effet bactériostatique
<b>Supérieur 32</b>	Effet de tolérance

### III.7. Aromatogramme

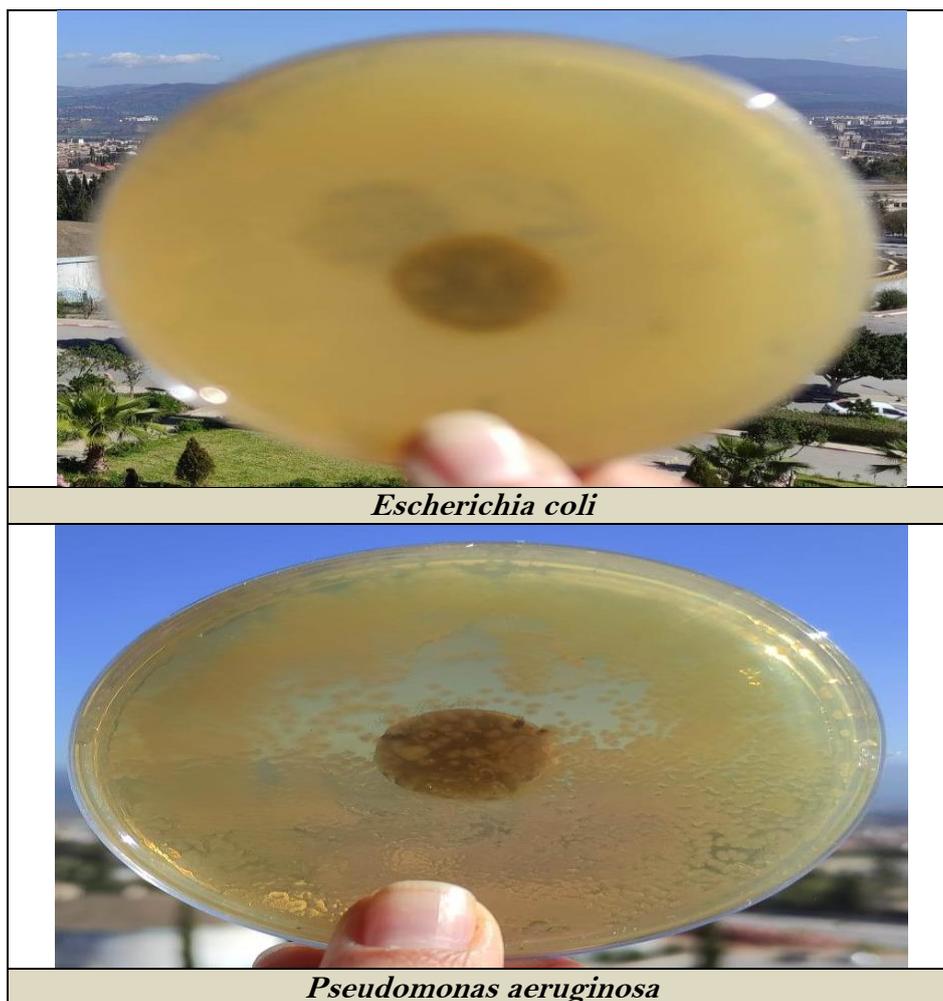
Les résultats obtenus de l'aromatogramme de l'extrait méthanoïque de la plante *Rosmariuns officinalis* étudié vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella*

*pneumoniae* sont mentionnées dans le **tableau 09** et les photos présent dans le **tableau 10**. Les résultats obtenus ont indiqué que le composé volatil contenu dans l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* possède une bonne activité antimicrobienne contre *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre de  $49 \pm 01$  mm, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a indiqué une légère zone irrégulière d'inhibition. Cependant, aucune zone d'inhibition n'a été retrouvée pour l'espèce *Escherichia coli*.

**Tableau 9** : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* (Moyenne  $\pm$  écart type).

Souches bactériennes	Zone d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	$00 \pm 00$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Légère zone irrégulière
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$49 \pm 01$

**Tableau 10** : Aromatogramme de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches bactériennes.





Les travaux réalisés par [Ouibrahim \(2015\)](#) sur *Rosmarinus officinalis* ont indiqué des résultats différents, ou un diamètre de 15,9 mm a été retrouvé pour l'espèce *Escherichia coli*, 12 mm pour l'espèce de *Klebsiella pneumoniae* et aucun effet retrouvé pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Aussi, les travaux de [Mouas et al. \(2017\)](#), ont indiqué des zones d'inhibitions comprises entre 9,25 mm et 9,5 mm pour l'espèce *Escherichia coli* et 15 mm pour l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence comme la concentration des molécules bioactives trop faibles ([Ariyanti et al., 2012](#)), la région et la période de récolte de la plante. Aussi, la sensibilité des micro-organismes dépend de la composition chimique et la concentration des composés volatils utilisés et le type de micro-organismes testés. La résistance d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*, peut être attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible ([Akrouit et al., 2010](#)).

# **Conclusion et Perspectives**

A cours des résultats obtenus, il ressort que :

- La richesse potentielle de la plante *Rosmarinus officinalis* en molécules bioactives.
- Le rendement de l'extrait méthanoïque est assez faible de l'ordre de 4,124 %.
- Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau de la plante *Rosmarinus officinalis* comme des anthocyanes, anthraquinones libres et anthraquinones combinées C-hétérosides, composés réducteurs, flavonoïdes, leucoanthocyanes, tanins galliques. Toutefois, les alcaloïdes, anthraquinones combinées O-hétérosides, tanins catéchiques et les mucilages n'étaient pas présents.
- L'antibiogramme a indiqué que l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* possédait un effet antibactérien contre *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.
- L'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* possédait un effet bactéricide vis à vis d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*.
- L'aromatogramme a indiqué que l'extrait méthanoïque de *Rosmarinus officinalis* a une bonne activité antimicrobienne contre *Klebsiella pneumoniae*.

En perspectives, il serait judicieux de :

- Tester l'activité antifongique.
- Doser les constituants bioactifs.
- Utiliser des souches pathogènes.

# **Références bibliographiques**

- Abedini, A., 2013. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelle d'hyptis *atrorubens* Poit. (*Lamiaceae*), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Option : Science des médicaments. Université Lille 2, Droit et Santé. Lille. France. p. 211. Disponible sur : <http://theses.hal.science>.
- Aissaoui, A.B., Zantar, S., El amrani, A., 2018. Étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* et évaluation de son effet acaricide sur l'acarien ravageur *Tetranychus Urticae* koch. *Af. Sci.* 14 : 411 – 423.
- Akrout, A., El Jani, H., Amouri, S., Neffati, M., 2010. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* l., *Artemisia herba alba* asso, & *Thymus capitatus* hoff. Et link. Growing wild in the southern of Tunisia. *Recent Res. Sci. Tech.* 2: 29–39.
- Akshay, K., Swathi, K., Bakshi, V., Boggula, N., 2019. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *J. Drug. Deli. Thera.* 9: 323-330.
- Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H., 1997. Etude comparative des huiles essentielles de *Rosmarinus eriocalyx* jordan & fourr. D'Algérie et *R. officinalis* L. d'autres pays. *Recherche sur les huiles essentielles.* 09: 167-175.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diskmethod. *Am. J. Clin. Pathol.* Apr. 45: 493 - 496.
- Belhaoues, S., Amri, S., Bensouilah, M., 2020. Major phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Anthemis praecox* Link aerial parts. *South Af. J. Bot.* 131 : 200-205.
- Benhalima, L., 2016. Contribution à l'étude des paramètres microbiologiques des eaux de la cal Messida et impact sur la santé publique et animale (W. El-Taref). Thèse de doctorat, Université Badji mokhtar Annaba, Algérie. p.350.
- Bolou, G.E.K., Attioua, B., N'Guessan, A.C., Coulibaly, A., N'Guessan, J.D., Djaman, A.J., 2010. Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bul. Soci. Roy. Sci. Liège.* 80 : 772 – 79.
- Borges, R.S., Sánchez Ortiz, B., L., Matias Pereira, A.C., Keita, H., Tavares Carvalho, J.C., 2019. Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* : revue de sa phytochimie, de son activité anti-inflammatoire et des mécanismes d'action impliqués. *J. Ethn.* 229 : 29-45.
- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N.S., Abrini, J., 2006. Thymus essential oil: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities.

- Congrès international de biochimie. Agadir. Maroc.09-12. Disponible sur : <https://www.researchgate.net/profile/Abdesslam-Zhiri>.
- Bousbia, N., 2011. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse de doctorat. Option : Chimie. Ecole nationale supérieure agronomique. Alger. Algérie. p.128. Disponible sur : <https://theses.hal.science>.
- 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). Bull. Soci. Royale Sci. Liège. 85 : 174 – 189.
- Bouzabata, A., 2015. Contribution à l'étude d'une plante médicinale et aromatique *Myrtus communis* L. Thèse de doctorat. Option : Sciences Pharmaceutiques. Université Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p : 152. Disponible sur : <http://theses.hal.science>.
- Bruneton, J., 1993. Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition. Paris, France, Lavoisier. p. 16.
- Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> Edition. Tec and Doc. Paris. p.1292.
- Chaib, S., 2021. Encapsulation d'une huile essentielle extraite de *Thymus vulgaris* : Effet sur ses propriétés physicochimiques et biologiques. Thèse de doctorat. Option : Biotechnologie microbienne. Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi. Algérie. p.132. Disponible sur : <http://bib.univ-oeb.dz>.
- Cowan, M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clini. Microbiol. Rev.*12: 564-582.
- Daira, N.H., Maazi, M.Ch., Chefrou, A., 2016. Contribution à l'étude photochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) De l'Est Algérien. Bull. Soci. Roy. Sci. Liège. 85 : 276 – 290.
- Damerdj, A., 2012. La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale). *Af. Sci.* 08: 79- 87.
- Deans, S., Ritchi, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Inter. J. Food Microbiol.* 5: 165-180.
- Debazac, E., 1991. Manuel des conifères. E.N.G.R.E.F.-Nancy. 2<sup>ème</sup> édition. p.172.
- Djahra, A.B., Bordjiba, O., Benkherara, S., 2012. Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Rev. Sci. Technol.* 24 : 29-37.
- Djousse, K.B.M., Ngoone, N.F., Djoukeng, H.G., Nono, L.W., Sogang, H.S., Tangka, J.K., 2022. Extraction et Caractérisation des Huiles Essentielles de Trois Plantes

- Aromatiques Cultivées à l'Ouest-Cameroun : *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Cymbopogon citratus*. Research article. Cameroon J. Biol. Bioch. Sci. 30: 121-13.
- Dorman H, J., Deans S, G., 2000. Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plant volatif oils. J. Appl. Microbiol. 88 : 308-16.
- Duraffourd, C., Lapraz, J.C., Chemli, R., 1997. La plante médicinale de la tradition. Edition Grancher. Paris. p.538.
- Edeogal, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O., 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. Af. J. Biotech. 4: 685-688.
- Edrah, S.M., Alafid, F., Imramovský, A., Altwair, K., Alkhumsi, S.I., Hrdina, R. 2017. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Genista microcephala* and *Rosmarinus officinalis* extracts from libyan's regions. J. Res. Ayurveda Pharm. 8: 250-300.
- Fadi, Z., 2011. Le romarin *Rosmarinus officinalis* le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal. Thèse de doctorat. Option : Pharmacie. Université Mohammed V. Faculté de médecine et de pharmacie. Rabat. Maroc. p.135. Disponible sur : <https://toubkal.imist.ma>.
- Fadili, K., Amalich, F., Soro, K., dedianhoua, N., Bouachrine, M., Mahjoub, M., El Hilali, F., Zair, H., 2015. Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc : *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. Inter. J. Sci. Res.17: 24-33.
- Fedjer, Z., Mazari, A., Blama, A., 2022. Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de Souk-Ahras cas du Romarin à Taoura et du figuier de Barbarie à Sidi-Fredj. Rech. Agr. 20 : 43-60.
- Genena, A.K., Hense, K., Smânia Junior, A., Souza, S.M., 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. J. Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas. 28 : 463-469.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothér. 3 :162-169.
- Gilly, G., 2005. Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à Grasse. Edition Harmattan. p.418.
- González-Minero, F.J., Bravo-Díaz, L., Ayala-Gómez, A., 2020. *Rosmarinus officinalis* L. (*Rosemary*): an ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. Cosmetics. DOI : 10.3390. [www.mdpi.com/journal/cosmetics](http://www.mdpi.com/journal/cosmetics).

- González-Trujano M.E., Peña, E.I., Martínez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Déciga-Campos, M., 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. J. Ethnopharm. 111 : 476-482.
- Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A., Benmansour, A., 2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*. Af. Sci. 05: 246 - 259.
- Hamidpour, R., Hamidpour, S., Grant Elias, G., 2017. *Rosmarinus officinalis* (rosemary): a novel therapeutic agent for antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic, antidepressant, neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-obesity treatment. Bio. J. Sci.Tech. Res. 1: 2574-1241.
- Harrane, A., 2012. Écologie et systématique du genre *Rosmarinus* L. dans la région de sud Algérois. Thèse de doctorat. Option : Écologie et environnement. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. Djelfa. Algérie. p.119. Disponible sur : <http://pnst.cerist.dz>
- Helal, Y., 2010. Etude de biomasse du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) dans le massif des Beniimloul, Algérie. Forest Sci. 3 : 18-22.
- Hoefler, C., 1994. Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, antihépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques. Thèse de doctorat. Option : Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine – Metz. France. p.148. Disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr>
- Iserin, P., 2001. Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Edition Larousse. France. p.335.
- Joffin, J.N., Leyral, G., 2006. Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. 1<sup>ère</sup> Edition. Bordeaux. p.248.
- Johar, S., Irfan, S., Ahmed, S., Jabeen, R., 2015. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. against *Escherichia coli*. Local isolates. Inter. J. Basic Appl. Sci. 4: 413-421.
- Karadag, A.E., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M.E., Orake, D., Sipahi, H., Baser, K.H.C., 2019. Evaluation antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique in vitro des fractions d'extraits de fleurs de *Rosmarinus officinalis* L. J. Sud Afr. Bot. 125 : 214-220.
- Karouche, S., Henouda, S., Benbott, A., Mihrab, K., 2021. Contribution à l'étude des substances bioactives et des activités biologiques de l'espèce *Rosmarinus officinalis*-L. Inter. J. Nat. Res. Envir. 3: 53-60.

- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O., 2004. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. J. Medical. Sci. 4: 179-182.
- Kelen, M., Tepe, B., 2008. Chemical composition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. Biores. Technol. 99 : 4096-4104.
- Laouini, S., 2014. Etude phytochimique et activité biologique d'extraits des feuilles de *phoenix deactylifera* l. Dans la région du sud d'Algérie (région d'Oued Souf). Thèse de doctorat. Option : Génie Chimique. Université Mohamed Khider. Biskra. Algérie. p. 392. Disponible sur : <http://thesis.univ-biskra.dz>
- Leplat, M., 2017. Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Thèse de doctorat. Option : Pharmacie. Université d'Aix. Faculté de pharmacie. Marseille. France. p.229. Disponible sur: <http://dumas.ccsd.cnrs.fr>.
- Loto, C.A., 2011. Inhibition effect of tea extract on the corrosion of midl steel in dilute sulphuric acid. J. Mat. Envir. Sci. 254: 335-344.
- Makhloufi, A., 2013. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat. Option : Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. Université Aboubakar Belkaide. Tlemcen. Algérie. p. 166. Disponible sur : [www.dspace.univ-tlemcen.dz](http://www.dspace.univ-tlemcen.dz).
- Marmonier, A.A., 1990. In : Technique de Diffusion en gélose : Méthode des disques. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. [Denis, D.F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (eds.)], Elsevier Masson. France. pp.615.
- Maurice, N., 1997. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Edition Lavoisier. Paris. p.1214.
- Maziane, D., 2014. Extraction assistée par micro-ondes des antioxydants à partir du *Rosmarinus officinalis* L. Thèse de doctorat. Option : Chimie organique appliquée. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene. Alger. Algérie. p. 136. Disponible sur : [www.theses-algerie.com](http://www.theses-algerie.com).
- Mouas, Y., Benrebiha, F., Chaouia, Ch., 2017. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* l. Rev. Agrobiol. 7 : 363-370.
- N<sup>o</sup>Guessan, K., Kadja, B., Zirihi G, N., Traoré, D., Aké-Assi, L., 2009. Screening photochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-D'ivoire). Sci. Nat. 6 : 1-15.

- Neffar, F., Benabdrrahmene, Z., 2013. Quantification des huiles essentielles dans deux espèces de romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de djebel metllili (Batna). Rev. Agricul. 05 : 19 – 23.
- Ouibrahim, A., 2015. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Thèse de doctorat. Option : Toxicologie. Université Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p. 95. Disponible sur : <https://biblio.univ-annaba.dz>.
- Outaleb, T., 2016. Extraits de romarin d'Algérie (*Rosmarinus officinalis* L. et *Rosmarinus tournefortii* De Noe) : analyse chimique et activités antioxydantes et antimicrobiennes. Thèse de doctorat. Option : Sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure d'agronomie. Alger. Algérie. p.132. Disponible sur : <http://dspace.ensa.dz>.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. p.1170
- Richard, A., 2012. Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquée à la dermatologie. Thèse de doctorat. Option : Vétérinaire. Université Claude- Bernard, Lyon I. Lyon. France. p. 223. Disponible sur : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr>.
- Roux, D., Catier, O., 2007. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3<sup>ème</sup> édition, Wolters Kluwer. France. p. 141.
- Sanon, E., 1992. Arbre et arbrisseaux en Algérie O.P.U. Ben Aknoun. N°686. Algérie. p.121.
- Seddiek, S.A., Ali, M.M., Khater, H.F., El-Shorbagy, M.M., 2011. Activité anthelminthique de l'absinthe blanche, *Artemisia herbaalba* contre *Heterakis gallinarum* infectant les dindonneaux. J. Med. Plant. Res. 5 : 3946-3957.
- Toure, D., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Option : Chimie Biologie. Université Félix Houphouet-Boigny. Cote d'ivoire. p. 252 : Disponible sur : <http://theses.hal.science>.
- Wechesser, S., Engel, K., Simon, H.B., Wittmer, A., Pelz, K., Schempp, C.M., 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. J. Phytomed. 14: 508-516.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chaboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., Kunz, W., 2016. Activité antioxydante des résidus d'eau d'hydro-distillation *Rosmarinus officinalis* feuilles de L. déterminées par dosages DPPH. Comp. Rend. Chim. 19: 754-765.

Yrjöen, T., 2004. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. P.64. Disponible sur: <https://core.ac.uk>.

Zemmouri, H., 2015. Etude des activités biologiques et effets comparatifs de *Borago Officinalis* et *Urtica dioica* sur l'inflammation bronchique dans un modèle d'asthme expérimental chez les rats de la souche Wistar. Thèse de doctorat. Option : Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar, Annaba. Algérie. p.211. Disponible sur : <https://fr.scribd.com>.