

RESEARCH ARTICLE

Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Lattab Aicha^{1,2*}, Khouatemiani Adnane Adel¹, Tounsi Imen¹, Boudiaf Aouda¹, Harizi Nada¹, Djida Mouna¹

¹Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre, Université Djilali Bounaama, 44001, Khemis Miliana, Algérie. ²Laboratoire Agrobiotechnologie, Ressources Génétiques et Modélisation (AGROBIOGEN), Université Abdelhamid Ibn Badis, 27000, Mostaganem, Algérie.

*aicha.lattab@univ-dbkm.dz

Received: March 27, 2024/ Accepted: June 5, 2024/ Published: July 15, 2024

Résumé

Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa* sont des micro-organismes pathogènes opportunistes responsables de graves infections nosocomiales qui posent des défis thérapeutiques majeurs. Leur résistance multiple aux antibiotiques, combinée à leur capacité à développer de nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition aux médicaments, rend le traitement de ces infections complexe. Dans ce contexte, nous nous concentrons sur l'étude de l'action antibactérienne des huiles essentielles provenant des feuilles de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Romarin), récoltées dans la région d'Ain Defla (Ain Torki), sur des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats obtenus par la technique de diffusion des puits montrent que, les huiles essentielles testés ont présenté un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec des zones d'inhibitions situées autour de 27 mm et 16 mm ont été enregistré par les huiles essentielles pures respectivement. Suivant les valeurs enregistrées par l'aromatogramme, les deux bactéries étudiées n'expriment pas la même susceptibilité envers les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, où cette remarque a été confirmée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui indique que *Staphylococcus aureus* a été inhibée à une concentration de 5%, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée à une concentration de 10%. Ceci signifie que les huiles essentielles de Romarin ont révélé une activité inhibitrice élevée contre *Staphylococcus aureus* comparativement à celle obtenu contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, huiles essentielles, activité antibactérienne

ABSTRACT

Staphylococcus aureus and *Pseudomonas aeruginosa* are opportunistic pathogenic microorganisms that pose significant therapeutic challenges due to their involvement in severe nosocomial infections. These pathogens exhibit multiple antibiotic resistances and have the capability to develop novel resistance mechanisms following exposure to antimicrobial agents, complicating the treatment landscape. In this study, we investigate the antibacterial properties of essential oils derived from the leaves of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), harvested in the Ain Defla region (Ain Torki), against clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizing the well diffusion assay, our results indicate that the essential oils demonstrate notable antibacterial activity against both *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, with inhibition zones measuring approximately 27 mm and 16 mm, respectively, when tested in their pure form. Differential susceptibility of the two bacterial strains to the essential oils was further corroborated by chromatogram data and minimum inhibitory concentration (MIC) assessments. Specifically, the MIC values revealed that *Staphylococcus aureus* exhibited inhibition at a concentration of 5%, whereas *Pseudomonas aeruginosa* required a higher concentration of 10% for inhibition. These findings suggest that the essential oils of *Rosmarinus officinalis* possess a significantly higher inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* compared to *Pseudomonas aeruginosa*. Further research is warranted to explore the broader spectrum antibacterial potential of these essential oils, as well as their safety profile and potential toxicity. Additionally, investigating possible synergistic effects between *Rosmarinus officinalis* essential oils and other antibacterial agents could provide insights into optimizing their therapeutic efficacy.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, essential oils, antibacterial activity.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est l'un des agents pathogènes les plus fréquemment associés aux infections nosocomiales. Elle a une importance clinique majeure, d'abord, en tant qu'une bactérie commensale qui colonise la peau et/ou les muqueuses des mammifères et en tant qu'agent pathogène opportuniste

capable de déclencher diverses maladies, telles que des infections cutanées mineures, des endocardites, des bactériémies et des pneumonies sévères (Gillet *et al.*, 2002 ; Wyllie *et al.*, 2006). La gravité de cette souche pathogène dépend en fait de divers facteurs, dont la résistance aux

antibiotiques, ce qui représente une sérieuse menace pour la santé publique (De Boer et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa, un pathogène opportuniste à Gram négatif, est couramment présent à la fois dans notre environnement et dans le corps humain tant que partie de la flore bactérienne normale (Pál, 2012). C'est l'une parmi les bactéries nosocomiales les plus dangereuses en raison de sa multirésistance (Shariati et al., 2018), étant impliquée dans au moins 10% des infections hospitalières (Pál, 2012). Les infections causées par *P. aeruginosa* présentent un défi particulier en termes de traitement en raison des mécanismes naturels de résistance aux antibiotiques qu'il possède. (Poole, 2001 ; Pool, 2011). Depuis l'Antiquité, l'homme a exploité les plantes aromatiques et médicinales. De nos jours, leur utilisation a connu une expansion remarquable dans les domaines des parfums, des cosmétiques et de la pharmacie. L'Algérie, dotée d'une grande diversité climatique et de sols, ainsi que d'une situation géographique et de reliefs variés, abrite une flore riche comptant pas moins de 3 510 espèces. Parmi la multitude de plantes disponibles, notre sélection s'est portée sur le *Rosmarinus officinalis* L., une espèce qui se pousse à l'état naturel dans les régions nordiques caractérisées par un climat tempéré et semi-aride. Ce choix découle de sa large distribution et de son utilisation répandue dans la médecine traditionnelle, en raison de ses nombreuses propriétés thérapeutiques reconnues par leur efficacité (Karouche et al., 2021). *Rosmarinus officinalis* L., de la famille des *Lamiaceae* et plus communément connu sous le nom de romarin, est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen. Les feuilles fraîches ou séchées de romarin sont prisées pour leur parfum distinctif en cuisine ou pour leur utilisation en infusion. Parallèlement, les extraits de romarin sont largement employés comme agents naturels antioxydants et antimicrobiens (Bozin et al., 2007 ; Laura et al., 2010) afin d'augmenter la durabilité des aliments sujet à la détérioration. Cette plante est largement employée dans les médecines traditionnelles à travers de nombreux pays, s'étendant même au-delà de son lieu d'origine méditerranéenne.

L'objectif de cette étude est de mesurer l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles de romarin récolté de la région d'Ain Turki (Ain Defla), contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIEL ET METHODES

Isolats bactériens

Les bactéries testées dans cette étude sont des isolats cliniques de l'espèce *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, fournie par le Laboratoire d'analyses médicales et biologiques dirigé par Dr Abdellah Zibouche à Ain Defla. Les isolats ont été identifiés à l'aide des tests phénotypiques et complétés par l'utilisation du système API 20NE (bioMérieux Marcy-l'Etoile, France).

Matériel végétal

La plante Romarin (*Rosmarinus officinalis*) (figure 1) a été récoltée à l'état frais dans la wilaya d'Ain Defla (région d'Ain Turki) au mois d'avril 2023. La partie aérienne de la plante choisie (les feuilles) a été soigneusement nettoyée puis séchée à l'air libre, loin de toute exposition à la lumière.



Figure 1. *Rosmarinus officinalis* récoltée dans la région Ain Turki (Ain Defla).

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de romarin ont été obtenues en utilisant la méthode d'hydrodistillation avec un dispositif de type Clevenger. Une quantité de 150 g de feuilles de romarin séchées a été introduite dans un ballon de deux litres contenant 1200 ml d'eau distillée. Le tout a été placé dans un ballon chauffant connecté à un réfrigérant pour permettre la condensation des huiles essentielles pendant une période de 3 heures de distillation (figure 2) (Duru et al., 2003). Une fois l'extraction terminée, les huiles essentielles ont été récoltées et stockées dans l'obscurité à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation.

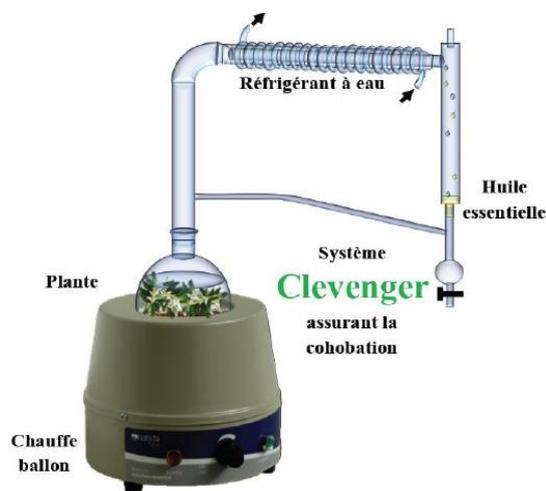


Figure 2. Illustration du dispositif d'hydrodistillation type Clevenger (Sources: Arabi, 2018).

Après l'extraction des huiles essentielles, leur rendement a été évalué en fonction du poids des huiles extraites par rapport au poids total de la matière végétale utilisée. Ce rendement est calculé selon la formule suivante. (Kusuma et Mahfud, 2017) :

$$Rdt = \frac{M_{HE}}{M_p} \times 100$$

Rdt : rendement en huile (%); M_{HE} : masse d'huiles essentielles (g); M_p : masse de la plante extraite (g).

Effet antibactérien des HEs de *Rosmarinus officinalis*

L'efficacité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles de la plante *Rosmarinus officinalis* a été évaluée contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant la méthode de diffusion des puits sur milieu gélosé MH.

Cette technique implique l'utilisation d'un comporte-pièce pour creuser des puits de 6 mm de diamètre dans la gélose MH ensemencé préalablement par les bactéries testées (Tepe et al., 2005). Ensuite, 40µl d'huile essentielle pure ou l'une des trois dilutions d'huile (3/4, 1/2 et 1/4) préparées avec du tween 80 ont été ajoutés à chaque puits. Le tween 80 a également été utilisé pour remplir le cinquième puits afin de vérifier son absence d'activité sur les bactéries. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, l'activité antibactérienne s'est révélée par l'observation de zones d'inhibition autour des puits.

Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode de macrodilution en milieu solide, comme décrite par Remmal et al. (1993) et Farah et al. (2001), a été utilisée pour évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles extraites des feuilles de *Rosmarinus officinalis*. Les dilutions de 10%, 7.5%, 5% et 2.5% ont été préparées pour évaluer la CMI des huiles essentielles par l'utilisation de Tween 80 et la gélose MH en surfusion contenant dans des tubes à essai. Ensuite, en agitant le contenu de chaque tube pour assurer l'homogénéisation du milieu MH avec les huiles essentielles, le mélange a été directement versé dans des boîtes de Pétri, puis il a été laissé à refroidir et à solidifier. Les boîtes préparées sont ensemencées en stries avec la bactérie testée. La CMI est représentée par la concentration de boîte où aucune culture bactérienne n'est présente après une incubation de 24h à 37°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement d'extraction en HEs

Le rendement d'extraction des huiles essentielles a été calculé en fonction du poids de la matière végétale sèche de *Rosmarinus officinalis* extraite. D'après les résultats obtenus, le rendement d'extraction se situe autour de 1,6%. Celui-ci est conforme aux normes de l'AFNOR (0,5% et 2%). Ce résultat corrobore avec les résultats de Zaouali et al. (2013), qui ont constaté un rendement de 1,43 % sur les feuilles de romarin récoltées pendant la floraison. Par contre, les résultats obtenus par Derwich et al. (2011) ont révélé un faible rendement d'extraction de 0,54% sur les échantillons de romarin au Maroc.

Le taux d'extraction des huiles essentielles est influencé par divers facteurs, notamment la localisation géographique de l'espèce végétale. (Fechtal et al., 2001 ; Derwich et al., 2011), son stade phénologique ainsi que la saison de collecte sont des facteurs à considérer. La période de floraison, qui se situe généralement entre mars et avril, semble être idéale pour récolter ce type de plante aromatique. En effet, c'est pendant cette période que ses composés actifs tels que les huiles essentielles sont synthétisés et stockés principalement dans les feuilles et les sommités fleuries (Boutekedjiret et al., 1999). en plus de l'organe végétatif sélectionné pour l'extraction des huiles essentielles (Zaouali et al., 2013).

Les méthodes d'extraction en laboratoire et le type d'appareil utilisé ont également un impact sur la qualité et la quantité produite, où les huiles essentielles extraites par hydrodistillation avec un réfrigérant serpentin diffèrent de celles extraites par hydrodistillation avec un réfrigérant simple (Aghfir et al., 2007).

Activité antibactérienne

D'après les résultats d'effet antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* provenant de la région d'Ain Torki (Ain Defla) sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (figure 3, tableau 1), les huiles essentielles extraites par hydrodistillation des feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* ont manifesté un effet antibactérien contre les deux bactéries étudiées.

L'analyse des zones d'inhibition pour les différentes concentrations testées révèle une diminution de cette activité lorsque la concentration des huiles essentielles est réduite. L'efficacité de cette activité varie également selon l'espèce testée. Une activité plus élevée a été observée contre *Staphylococcus aureus* par rapport à *Pseudomonas aeruginosa*. Des zones d'inhibition de 27 mm ont été enregistrées avec les huiles essentielles pures contre *Staphylococcus aureus*, tandis qu'elles étaient de 15 mm contre *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après des recherches précédentes, les huiles essentielles extraites de *Rosmarinus officinalis* affichent une forte capacité à inhiber la croissance de diverses espèces bactériennes pathogènes. Selon Les travaux de Mouas et al. (2017) sur l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* provenant des écotypes Blida et Djelfa, évaluée contre cinq souches bactériennes testées. (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*), les résultats révèlent que l'huile essentielle du romarin provenant des régions de Blida et de Djelfa montrent une efficacité notable contre la plupart des bactéries testées, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. Les données révèlent aussi que les isolats les plus sensibles aux huiles essentielles des deux écotypes examinés sont *S. aureus* et *E. faecalis*, avec des zones d'inhibition mesurant respectivement 23,75 mm et 22,75 mm (Blida), et 16,75 mm et 14,25 mm (Djelfa). Par contre l'activité antibactérienne des huiles essentielle de *Rosmarinus officinalis* contre *Pseudomonas aeruginosa* a été indiquée dans une étude réalisée par Majda et al. (2022) où ils ont montré l'activité antibactérienne contre *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 et *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Selon Kalembe et Kunicka (2003), la susceptibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend à la fois des propriétés de ces huiles et des caractéristiques intrinsèques du microorganisme testé. Il est admis que les bactéries Gram positives sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatives. Plusieurs travaux de recherche évaluant l'effet inhibiteur des huiles essentielles confirment ce constat.

Le mode d'action des HEs est principalement lié à la structure de la paroi cellulaire et à la perméabilité membranaire des bactéries, qu'elles soient Gram positives ou à Gram négatives. La présence d'une enveloppe externe hydrophile chez les bactéries Gram négatives empêchant les molécules

hydrophobes telles que les HEs d'arriver jusqu'à la membrane cytoplasmique pour la détruire.

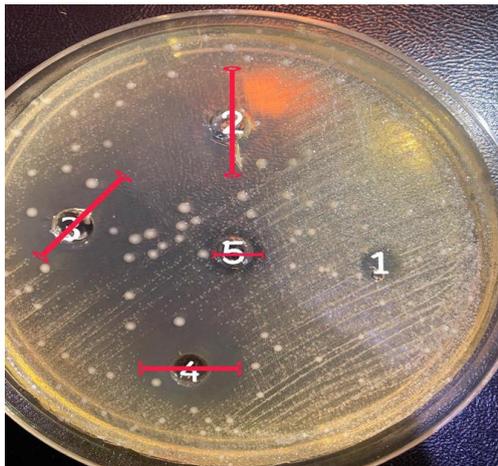


Figure 3 : Résultat d'Aromatogramme des HEs de *Rosmarinus officinalis* contre *Staphylococcus aureus*

Tableau 1. Effet antibactérien des huiles essentielles du romarin contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Concentration en HE (%)	Diamètre des zones d'inhibitions en (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
100	27	15
75	22	9
50	15	/
25	9	/

(/) Absence de zone d'inhibition

Concentration Minimale Inhibitrice

Le résultat de l'évaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (Figures 4 et 5) indique qu'à partir d'une concentration de 5% en huiles essentielles, aucune croissance visible n'a été observée sur le milieu gélosé inoculé avec *S. aureus*, tandis que pour *P. aeruginosa*, l'inhibition de croissance a été enregistrée autour de 10%. Cela indique que les huiles essentielles testées présentent une CMI d'environ 5% contre *S. aureus* et de 10% contre *P. aeruginosa*.

Les résultats concernant les valeurs de CMI des huiles essentielles de deux chimiotypes de romarin qui ont été enregistrés dans l'étude menée par Majda et ses collaborateurs en 2022 sont situées autour de 0.625mg/ml pour *S. aureus* avec les deux chimiotypes testés et chez *P. aeruginosa* sont situées autour de 2,5mg/ml avec chimiotype 1 et de 5mg/ml pour le chimiotype 2.

La différence enregistrée dans les valeurs de CMI entre les deux bactéries testées, peut être attribuée à la différence de sensibilité de la paroi cellulaire bactérienne entre les deux types de Gram chez les bactéries (Zhao et al., 2001). Les bactéries Gram négatives sont enveloppées dans une fine couche de peptidoglycane, qui est à son tour enveloppée dans une membrane externe contenant des lipopolysaccharides, créant ainsi une barrière contre les agents antimicrobiens. Alors que les bactéries Gram positives possèdent uniquement une couche de peptidoglycane, celle-ci est plus épaisse que celle présente chez les bactéries Gram négatives (Silhavy et al., 2010).

L'action antimicrobienne des huiles essentielles se manifeste par son interaction avec la bicouche lipidique de la bactérie, grâce à ses propriétés hydrophobes. Cela entraîne une augmentation de la perméabilité cellulaire, provoquant la fuite des constituants cellulaires. De plus, elle induit l'acidification de l'intérieur de la bactérie, perturbant ainsi la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structuraux. Enfin, elle endommage le matériel génétique et aboutissant à la mort de la bactérie (Caillet et Lacroix, 2007).

L'efficacité biologique des huiles essentielles est associée à leur composition et aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, terpènes, phénols et cétones), ainsi qu'à leurs effets synergiques, où une huile essentielle contient souvent entre 50 et 100 molécules biochimiques différentes (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Oussou et al., 2008 ; Oussou et al., 2010). Santoyo et al. (2005) ont démontré que la propriété antimicrobienne des huiles essentielle de *Rosmarinus officinalis* était associée à l' α -pinène, au 1,8-cinéole, au camphre, à la verbinone en plus du bornéol, où le bornéol présentait le plus d'efficacité, puis au camphre et à la verbénone. D'autres chercheurs ont également signalé les fortes activités antimicrobiennes du bornéol et du camphre (Tabanca et al., 2001 ; Chen et al., 2013).

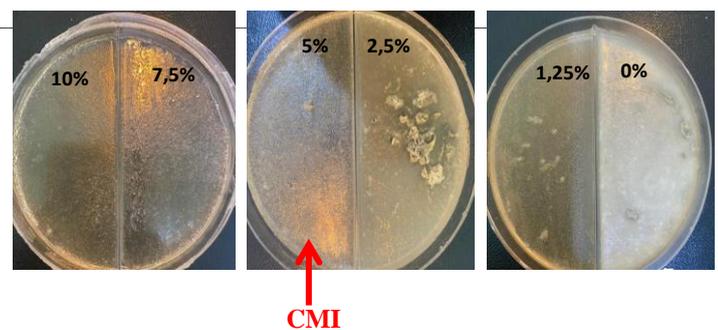


Figure 4. CMI des huiles essentielles de romarin contre *S. aureus*.

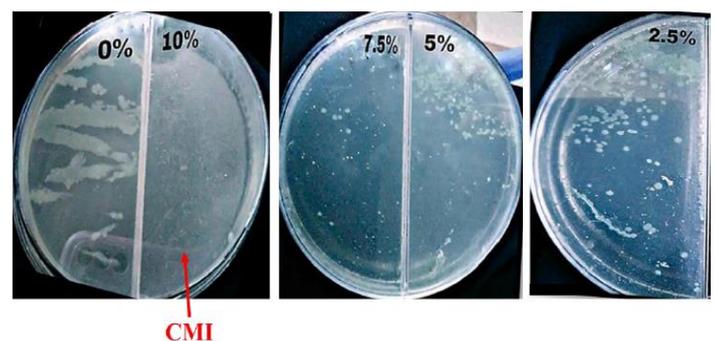


Figure 5. La CMI des huiles essentielles de romarin contre *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de *Rosmarinus officinalis* permettent de conclure que les huiles essentielles des feuilles de *Rosmarinus officinalis* de la région d'Ain Torki (wilaya d'Ain Defla) présentent une activité antibactérienne contre les deux bactéries testées. Cette activité s'est avérée plus élevée contre la souche de *S. aureus* que contre *P. aeruginosa*. Des

études complémentaires sont nécessaires pour explorer le potentiel de ces huiles essentielles dans le traitement d'autres pathogènes bactériens et pour évaluer leur sécurité et leur toxicité. Enfin, il serait pertinent d'examiner les synergies potentielles entre les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et d'autres agents antibactériens afin de maximiser leur efficacité thérapeutique.

RÉFÉRENCES

1. Aghfir, M. M. Kouhila, A. Jamali, L. Mohamed (2007). Séchage solaire convectif pour la conservation des feuilles de *Rosmarinus officinalis*. 13èmes Journées Internationales de Thermique, du 28 au 30 Août, France.
2. Arabi, A. (2018). Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse Doctorat, Université de Mostaganem, Algérie, 211.
3. Boutekedjiret, C. F. Bentahar, R. Belabbes & J.M. Bessiere (1999). Study of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil yield and composition as a function of the plant life cycle. *J. Essent. Oil Res*, 11 (2): 238-240. DOI:10.1080/10412905.1999.9701120.
4. Bozin, B. N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, E. Jovin (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19):7879–7885. DOI:10.1021/jf0715323.
5. Caillet S. & M. Lacroix (2007). Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA, 1-8.
6. Chen, W. I. Vermaak, and A. Viljoen (2013). Camphor-A Fumigant during the Black Death and a Coveted Fragrant Wood in Ancient Egypt and Babylon. A Review. *Molecules*, 18(5), 5434–5454. DOI:10.3390/molecules18055434.
7. DeBoer, E. J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X.W. Huijsdens, A.J. deNeeling, T. Bosch, R.A.A. van Oosterom, A. Vila, and A.E. Heuvelink (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (1–2), 52-56. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007.
8. Derwich, E. Z. Benziane, R. Chabir and R. Taouil, (2011). *In vitro* antibacterial activity and GC/MC analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3, 89-95.
9. Duru, M.E. A. Cakir, S. Kordali, H. Zengin, M. Harmadar, S. Izumi, T. Hirata (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74, 170-176. [http://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00318-0](http://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00318-0).
10. Farah, A. B. Satrani, M. Fechtal, A. Chaouch, M. Talbi (2001). Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* et son hybride naturel (clone 583). *Acta Botanica Gallica*, 148 (3), 183-190. <http://dx.doi.org/10.1080/12538078.2001.10515886>.
11. Fechtal, M. R. Ismaili, and A. Zine el Abidine (2001). Effet de la transplantation sur la qualité et le rendement en huiles essentielles du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). *Annales de la Recherche Forestière au Maroc*, 34, 94-102.
12. Gillet, Y. B. Issartel, P. Vanhems, J.C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piémont, N. Brousse, D. Floret and J. Etienne (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immuno competent patients. *Lancet*, 359(9308): 753-759. DOI:10.1016/S0140-6736(02)07877-7.
13. Gülçin, I.Ö.I. M. Küfrevioğlu Oktay and Büyükkuroğlu M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3):205–215. DOI:10.1016/j.jep.2003.09.028.
14. Kalembe, D. & A. Kunicka (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829. DOI:10.2174/0929867033457719.
15. Karouche, S. S. Henouda, A. Benbott, and K. Mihrab (2021). Contribution à l'étude des substances bioactives et des activités biologiques de l'espèce *Rosmarinus officinalis*-L. *International Journal of Natural Resources and Environment*, 3(1) :53-60.
16. Kusuma, H.S. and M. Mahfud (2017). The extraction of essential oils from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using a microwave air-hydrodistillation method as a new green technique. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 1336-1347. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA25894H>.
17. Laura, P.F. M.T. Garzón, and M. Vicente (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1): 161–171. doi:10.1021/jf9026487.
18. Majda, E. E.O. Faıçal, L. Amal, E. Taha, B. Abdelhak, and E. Nouredine (2022). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Wild and Cultivated *Rosmarinus Officinalis* from Two Moroccan Localities. *Journal of Ecological Engineering*, 23(3): 214–222. DOI:10.12911/22998993/145458
19. Mouas, Y. F. Benrebaha, and Ch. Chaouia (2017). Évaluation De L'activité Antibactérienne De L'huile Essentielle Et De L'extrait Méthanolique Du Romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Agrobiologia*, 7(1): 363-370.
20. Oussou, K.R., S. Youlou, C. Kanko, K.N. Guessenn, Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 1: 94-103.
21. Oussou, K.R. S. Youlou, C. Kanko, B. Tue Bi, C. Kanko, J.B. Boti, C. Ahibo & J. Casanova (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (*Lamiaceae*). *European Journal of Scientific Research*, 1: 50-59.
22. Pál T. (2012). Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve. *Med. Könyvkiadó Bp. Zrt*, 3: 257-324.
23. Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

- and related organisms. *J molmicrobiol biotechnol.*, 3 (2): 255-264.
24. Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front Microbiol.*, 2: 65.
[DOI: 10.3389/fmicb.2011.00065](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065)
 25. Remmal, A. A. Tantaoui-Elaraki, T. Bouchikhi, K. Rhayour, M. Ettayebi (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5: 1179-1184.
<https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698197>
 26. Santoyo, S. S. Cavero, L. Jaime, E. Ibañez, F.J. Señoráns, and G. Reglero (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J Food Prot*, 68(4): 790–795.
[doi: 10.4315/0362-028x-68.4.790](https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.4.790)
 27. Shariati, A. T. Azimi, A. Ardebili, A.S. Chirani, A. Bahramian, A. Pormohammad, M. Sadredinamin, S. Erfanimanesh, N. Bostanghadiri, and S. Shams (2018). Insertional Inactivation of OprD in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.*, 21: 75-80.
[DOI: 10.1016/j.nmni.2017.10.013](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.013)
 28. Silhavy, T.J. D. Kahne, S. Walker (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, 1-16.
<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
 29. Tabanca, N. N. Kirimer, B. Demirci, F. Demirci, and K.H.C. Başer (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria cristata* subsp. phrygia and the Enantiomeric Distribution of Borneol. *J Agric Food Chem*, 49(9): 4300–4303.
<https://doi.org/10.1021/jf0105034>
 30. Tepe, B. D. Deferera, A. Sokmena, M. Sokmen, and M. Polissiou (2005). Antimicrobial and antioxydant activities of the essential oil and various extracts of *salvia tomentosa miller (Lamiaceae)*. *Food chemistry*, 90: 333-340.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>
 31. Wyllie, D.H. D.W. Crook, and T.E.A. Peto (2006). Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997–2003: Cohort study. *BMJ.*, 333(7566): 281.
[DOI: 10.1136/bmj.38834.421713.2F](https://doi.org/10.1136/bmj.38834.421713.2F)
 32. Zaouali, Y. H. Chograni, R. Trimech, and M. Boussaid (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. typicus Batt. Organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 43: 412-419.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044>
 33. Zhao, W.H. Z.O. Hu, S. Okubo, Y. Hara, T. Shimamura (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 45, 1737-1742.
<http://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1737-1742.2001>