

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie

Mémoire

De fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme du Master

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits bruts de
feuilles de *Pistacia lentiscus***

Réalisé par :
DERMEL Liza
BECHEKER Safia

Soutenu le 18/06/2015

Devant le jury :

M^r SEBBANE Hillal Maitre-assistant classe A à l'UMMTO..... **Président**
M^r HOUALI Karim Professeur à l'UMMTO**Promoteur**
M^{me} IRATNI AICHE Ghenima Maitre-assistant classe A à l'UMMTO..... **Co-Promoteur**
M^{me} MEGUENNI Nacima Maitre-assistant classe A à l'UMMTO..... **Examineur**
M^r MOUALEK Idir Maitre-assistant classe A à l'UMMTO..... **Examineur**

Année Universitaire 2014-2015

Remerciements

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire le Professeur HOUALI Karim. Nous le remercions de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées.

Le Professeur HOUALI a toujours eu une volonté de faire de son mieux pour aider tous les candidats. Sa gentillesse et sa patience ont été précieuses pour nous et sont bien au-delà des limites de la description; par conséquent, nous lui serons toujours reconnaissantes.

Nous remercions vivement M^{me} IRATNI AICHE; pour sa gentillesse, ses encouragements continus, pour ses précieux conseils et son assistance dans l'étude de cette thématique.

Nos remerciements vont aussi à M^{me} MEGUENNI et à M^r MOUALEK qui nous ont fourni des orientations notamment dans le travail expérimental.

Nous sommes reconnaissantes au Dr SMAÏL-SAADOUN, une exceptionnelle botaniste, qui a enrichi nos études supérieures avec ses discussions utiles et ses conseils sur les caractéristiques du mastic.

Nous tenons à remercier chaleureusement M^r SEBBANE de nous faire l'honneur d'être le président de notre jury.

Un grand merci pour tout le corps enseignant du département des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques notamment au chef du département de Biochimie-Microbiologie, BARIZ Karim qui se consacre à mettre de l'ordre dans le département et à pousser les étudiants à se surpasser dans leurs études.

Nous sommes très reconnaissantes envers les ingénieurs du laboratoire de Microbiologie M^{me} GUENDOZI Sonia, M^{me} HAMDAD Soraya et M^{me} BOUANEM Malika de nous avoir apportées leur aide et leur soutien dans notre travail expérimental.

Pour tous ceux dont les noms ne sont pas mentionnés, nous vous remercions tous.

Enfin, le premier et le dernier, nous remercions le Dieu tout puissant.



DERMEL Liza
BECHKEKER Safia

Jun 2015

Dédicaces

Nous remercions nos très chers parents, qui ont toujours été là pour nous, pour leur soutien et leurs encouragements inconditionnels

« Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous nous avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Nous vous serons redevables notre vie durant».

Nous remercions nos amis pour leur sincère amitié et confiance, et à qui nous devons notre reconnaissance et notre attachement.

Liza et Safia

Abstract:

Pistacia species from the Anacardiaceae family are widely distributed in Algeria. In this work, the crude extracts of *Pistacia lentiscus* collected in Timizart-Loghbar region (Kabylie) in center north from Algeria, were obtained by aqueous extraction (EA), ethanolic extraction (EE) and aqueous extraction assisted by sonication (ES) of the leaves .

The study was conducted to determine the antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* leaves against both bacteria using the disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC). For gram-negative: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa*, and for gram-positive: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* were used as test bacterial strains.

The yield of crude extracts of *Pistacia lentiscus* leaves were respectively 21.6%, 15.2% and 9.2% for ethanolic extract , aqueous extract and aqueous extract assisted by sonication.

In the present study gram-negative strains such as *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Klebsiella pneumoniae* are not sensitive to the extracts of *Pistacia lentiscus* with the exception of *Pseudomonas aeruginosa* which has shown inhibition zones of 18.666 ± 1.154 , 17 ± 0 and 12.333 ± 0.577 mm respectively for EA, ES and EE extracts.

With the exception of *Enterococcus faecalis* which showed no sensitivity, extracts from *Pistacia lentiscus* leaves were found to be active against gram-positive such as *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* at maximal zones of inhibitions of 18.666 ± 1.154 and 20.333 ± 6.350 mm, respectively.

The minimal inhibitory concentration values against these sensitive bacteria ranged from 0.005 to 0.01 g/mL.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, crude extracts, antibacterial activities.

Résumé :

Les espèces de *Pistacia* appartenant à la famille des Anacardiaceae sont largement distribuées en Algérie. Dans cette étude, les extraits bruts des parties aériennes de *Pistacia lentiscus*, qui a été récoltée dans la région de Timizart-Loghbar (Kabylie), située au centre-Nord de l'Algérie, ont été obtenus par une extraction aqueuse (EA), une extraction éthanolique (EE) et par une extraction aqueuse assistée par sonication (ES).

L'étude a été menée en vue de déterminer les activités antibactériennes des feuilles de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis des bactéries via l'utilisation de la méthode de diffusion par disque et de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour les Gram négatifs : *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, et pour les Gram positifs : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* ont été utilisées comme souches bactériennes d'essai.

Le rendement des extraits bruts des feuilles de *Pistacia lentiscus* était de 21.6%, 15.2% et 9.2% respectivement pour les extraits EE, EA, et ES.

Dans cette présente étude les gram-négatifs tels que *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, et *Klebsiella pneumoniae* ne sont pas sensibles aux extraits de *Pistacia lentiscus* à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré des zones d'inhibitions de 18.666 ± 1.154 , 17 ± 0 and 12.333 ± 0.577 mm respectivement pour les extraits EA, ES et EE.

A l'exception d'*Enterococcus faecalis* qui n'a montré aucune sensibilité, les extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* se sont avérés plus actifs vis-à-vis des gram-positifs tels que *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec des zones maximales d'inhibition de 18.666 ± 1.154 , 20.333 ± 6.350 mm, respectivement.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de ces bactéries vont de 0.005 à 0.01 g/mL.

Mots clefs : *Pistacia lentiscus*, extraits bruts, activité antibactériennes.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS+ : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) cationique

ALP : Phosphatase alcaline

ALT : Alanine aminotransférase

ANOVA : Analyse de la variance

AST : Aspartate aminotransférase

BCP : Pourpre de Bromocrésol

BEA: Bile Esculine Azide

BHIB: Brain-Heart Infusion Medium

CCC: Chromatographie à contre-courant

CCM: Chromatographie sur couche mince

CD36: Cluster of differentiation 36 ou Récepteur scavenger

CMG: Chios Mastic Gum / Gomme de Mastic Chios

DPPH : 2,2-diphényl-1- picrylhydrazyle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

EA : Extrait aqueux

Eau \varnothing : Eau physiologique

EE : Extrait éthanolique

ES : Extrait aqueux assisté par une sonication

G₁: Growth ₁

GN: Géloses nutritive

GSH: Glutathione sulfhydryl

HCT116 : Lignée cellulaire de cancer du côlon humain

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

K562 : Lignée cellulaire d'érythroleucémie humaine

kHz : kilohertz

LDL : Low density lipoprotein / lipoprotéines de basse densité

LNCaP : Lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine sensible à l'androgène

MH : Mueller Hinton

Ox-LDL : Oxidized low-density lipoprotein / lipoprotéine de basse densité oxydée

RAPD : Randon Amplified Polymorphic DNA

SFC : Chromatographie à contre-courant

sp : Espèce

Subsp : Subspecies/ sous-espèces

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violets

XO : Xanthine Oxydase

± : Ecart type

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Systématique complète de <i>Pistacia lentiscus</i>	02
Tableau II : Composés antimicrobiens de <i>Pistacia lentiscus</i>	09
Tableau III : Composés phytochimiques ayant des activités antioxydantes.....	12
Tableau IV : Composés phytochimiques ayant des activités anticancéreuses.....	14
Tableau V : Autres activités des composés phytochimiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	15
Tableau VI : Rendements des différents extraits exprimés en %.....	26
Tableau VII : Résultats de l'identification microbiologique des souches bactériennes testées.....	27
Tableau VIII : Résultats de la galerie biochimique d' <i>Escherichia coli</i>	31
Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque extrait des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	32
Tableau X : Résultats des CMI par la mesure de la DO à 620nm.....	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Distribution de <i>Pistacia lentiscus</i>	03
Figure 2: Quelques caractères botaniques de <i>Pistacia lentiscus</i>	05
Figure 3: Différentes classes de composés phénoliques.....	07
Figure 4 : Structures de certains constituants chimiques important de <i>Pistacia lentiscus</i>	08
Figure 5: Site géographique de la région de la récolte de l'échantillon.....	17
Figure 6: Feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> après séchage.....	17
Figure 7: Schéma récapitulatif des étapes des extractions.....	20
Figure 8: Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques.....	24
Figure 9: Schéma récapitulatif des étapes de la détermination de la CMI.....	25
Figure 10: Galerie biochimique d' <i>Escherichia coli</i> avant incubation.....	31
Figure 11: Galerie biochimique d' <i>Escherichia coli</i> après incubation 37°C/24h.....	31
Figure 12: Courbe représentant la DO de <i>Bacillus cereus</i> en fonction des différentes concentrations d'extraits.....	35
Figure 13: Courbe représentant la DO de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction des différentes concentrations d'extraits.....	35
Figure 14: Courbe représentant la DO de <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction des différentes concentrations d'extraits.....	36
Figure 15: Antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i>	37
Figure 16: Antibiogramme de <i>Citrobacter freundii</i>	39
Figure 17: Antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
Figure 18: Antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Figure 19: Antibiogramme d' <i>Enterococcus faecalis</i>	43
Figure 20: Antibiogramme de <i>Bacillus cereus</i>	44
Figure 21: Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	45

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	01

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Présentation de *Pistacia lentiscus*

1. Taxonomie et classification.....	02
2. Aire de répartition.....	03
3. Caractères botaniques.....	04
4. Caractères écologiques	06
5. Caractères toxicologique	06

Chapitre 2 : Composés phytochimiques biologiquement actifs

Composés antimicrobiens de <i>Pistacia lentiscus</i>	09
Composés phytochimiques ayant des activités antioxydantes	12
Composés phytochimiques ayant des activités anticancéreuses.....	14
Autres activités des composés phytochimiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	15

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1. Matériels	
1.1. Matériel végétal.....	16
1.1.1. Choix de la plante et de la partie de la plante utilisée.....	16
1.1.2. Situation géographique.....	16

1.1.3. La récolte du matériel.....	17
1.2. Souches bactériennes testées.....	18
1.2.1. Choix des bactéries.....	18
1.2.2. Milieux de culture utilisés.....	18
2. Méthodes	
2.1. Préparation des extraits.....	19
2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	19
2.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique.....	19
2.1.3. Préparation de l'extrait aqueux assisté par un sonicateur.....	19
2.2. Identification des souches testées.....	21
2.2.1. Revivification.....	21
2.2.2. Isolement.....	21
2.2.3. Coloration et observation.....	21
2.3. Détermination du pouvoir antibactérien.....	21
2.3.1. Méthode de diffusion sur disque.....	21
2.3.1.1. Préparation de l'inoculum et ensemencement.....	21
2.3.1.2. Préparation des extraits à tester.....	22
2.3.1.3. Technique de diffusion sur milieu gélosé.....	22
2.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	22

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Rendement.....	26
2. Résultats de l'identification.....	27
3. Détermination de l'activité antibactérienne.....	32
3.1. Détermination des zones d'inhibition.....	32
3.2. Analyse statistique des zones d'inhibition.....	33
4. Détermination de la CMI.....	34
4.1. Détermination de la CMI par la mesure de la DO.....	34
4.2. Courbes représentant les résultats de la mesure de la DO.....	35
4.3. Analyse statistique des densités optiques des CMI.....	36
5. Effet des extraits sur les souches testées.....	37
Conclusion et perspectives.....	49
Références bibliographiques.....	51

Introduction

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine traditionnelle, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (BELFADEL, 2009).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (FAMSWORTH *et al.*, 1985; FLEURENTIN et PELT, 1990). À l'origine, ces ressources étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, les différentes préparations d'extraits et de concentrés ont permis d'en intensifier l'effet médicinal (TYLER, 1999).

De part sa richesse en métabolites secondaires, notamment en polyphénols, un intérêt particulier, notamment dans la pharmacologie, est conféré à *Pistacia lentiscus*.

Par ailleurs, l'émergence de la multi-résistance des germes aux antibiotiques, nous incite à nous pencher vers des alternatives de rechange tel que le recours aux composés phytochimiques actifs issus de plantes médicinales autochtones telles que *Pistacia lentiscus*.

C'est dans ce contexte que nous avons jugé intéressant d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits bruts obtenus à la suite d'extractions aqueuse, aqueuse assistée par sonication et éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* issue de la région Timizart-Loghbar.

Le mémoire est organisé en plusieurs parties :

La première partie constitue la synthèse bibliographique, et est divisée en deux chapitres ; un premier chapitre est consacré à une présentation de *Pistacia lentiscus*, le deuxième chapitre traite des composés phytochimiques biologiquement actifs de cette plante.

La seconde partie traite en deux chapitres la partie expérimentale, le premier est consacré à la présentation du matériel et des méthodes expérimentales ayant permis la réalisation de ce travail, le second chapitre est consacré à la description et à la discussion des résultats obtenus. La fin du mémoire est réservée à la conclusion, aux perspectives envisageables et aux références bibliographiques.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1

Présentation de

Pistacia lentiscus

Le genre *Pistacia* appartient à la famille des Anacardiaceae, il comprend au moins 11 espèces ayant en quasi-totalité une aire de répartition tropicale et subtropicale (ZOHARY, 1952 ; KOKWARO et GILLET, 1980). *Pistacia* est sensé provenir de l'Asie centrale il y a 80 millions d'années (PARFITT et BADENES, 1997; KAFKAS et PERL-TREVES, 2002). Il compte quatre régions phytogéographiques : méditerranéenne, irano-touranienne, sino-japonaise et mexicaine (SEIGUE, 1985 in AIT SAID, 2011).

LINNAEUS (1753) a été le premier à établir le genre. La première monographie du genre a été fournie par ENGLER (1883), où il y figure huit espèces : *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. mexicana*, *P. mutica*, *P. terebinthus*, et *P. vera*.

Peu d'études systématiques ont été publiées sur cet important genre, le premier classement complet du genre a été publié par ZOHARY (1952) (**Tableau I**), qui a inclus 11 espèces dans le genre et les a divisées en quatre sections (AL-SAGHIR, 2006).

GAUSSEN *et al* (1982) considèrent que de part sa dioécie et ses fleurs nues, *Pistacia* est un genre particulier des Anacardiaceae pouvant constituer une famille à part : les Pistaciaceae.

1. Taxonomie et Classification :

Tableau I : Systématique complète de *Pistacia lentiscus* (NAHIDA *et al.*, 2012)

Règne	<i>Plantae</i> -Plantes
Sous-règne	<i>Viridiplantae</i>
Infrarègne	<i>Streptophyta</i> – Plantes terrestres
Superdivision	<i>Embryophyta</i>
Division	<i>Tracheophyta</i> –Plantes vasculaires
Subdivision	<i>Spermatophytina</i> – Spermatophytes-Phanérogames
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Super-ordre	<i>Rosanae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>
Nom binomiale	<i>Pistacia lentiscus</i> L (<i>Arbre à mastic</i>)

2. Aire de répartition :

L'air du lentisque s'étant sur tout le bassin méditerranéen (VERDU et GARCIA-FAYOS, 2002) et se rencontre dans les Iles Canaries et au Portugal (ALYAFI, 1979). Deux centres de diversité ont été décrits. Ils comprennent la région méditerranéenne de l'Europe, du Nord de l'Afrique et du Moyen-Orient. Le deuxième comprend l'Ouest et l'Asie centrale (**Figure 1**) (KAFKAS et PERL-TREVES, 2002; KAFKAS *et al.*, 2002, AL-SAGHIR, 2006)

En Algérie il occupe l'étage thermo-méditerranéen, sa limite méridionale se situe aux environs de Saida, sa présence au sud de l'Atlas saharien n'est pas signalée (AIT SAID, 2011).

On le retrouve sur tout type de sol, des zones subhumides et semi-arides, plus précisément dans le bassin de la Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (SMAIL-SAADOUN, 2002 ; FERRADJI, 2011). On le retrouve également en association avec l'oléastre, la salsepareille et le myrte dans un groupement végétal nommé l'oléolentisque (BROSSE, 2005 ; BELFADEL, 2009). Aussi, avec la filaire, il forme l'association *phillereo latifoliae-Pistacietum lentisci*, correspondant à un matorral issu de la dégradation de forêts thermo- méditerranéennes subhumides (BENABID, 2000).

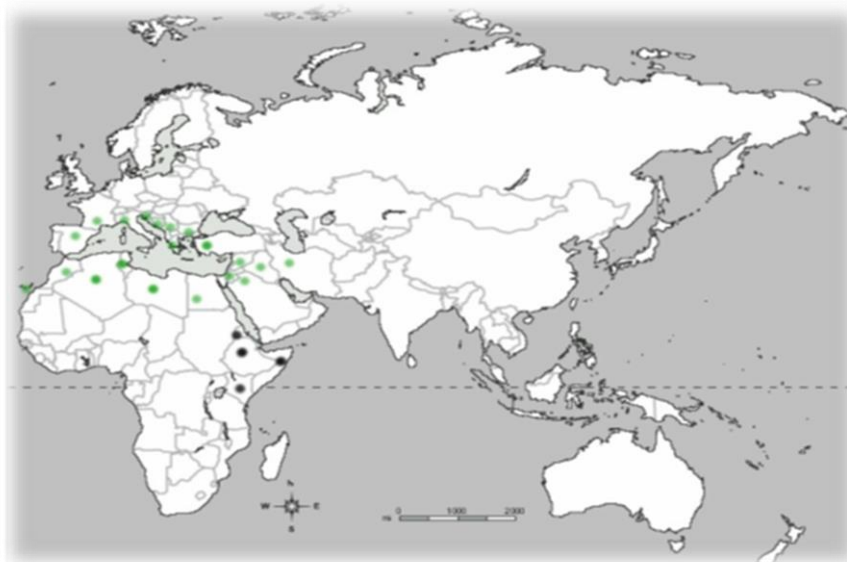


Figure 1: Distribution de *Pistacia lentiscus* (AL-SAGHIR, 2006)

Vert : *Pistacia lentiscus* subsp. *lentiscus*.

Noir : *Pistacia lentiscus* subsp. *emarginata*

3. Caractères botaniques :

Le lentisque est un arbuste sclérophylle à feuille persistantes, il est pourvu d'une odeur de résine fortement âcre et sa croissance est très lente. D'une hauteur de 2 m, il peut cependant atteindre la taille d'un arbre lorsqu'il est situé dans des régions humides et protégées (MUNNE-BOSCH et PENUELAS, 2003).

Les feuilles ont une durée de vie de 2 ans (AIN-LHOUT *et al.*, 2004) à rachis ailé, paripennées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) coriaces, d'un vert sombre, largement lancéolées, elliptiques, glabres, obtuses au sommet, brillantes au-dessus et de taille allant de 1.5 à 3 cm (MORE et WHITE, 2005 ; AIT SAID, 2011 ; FERRADJI, 2011).

Les fleurs sont sessiles, unisexuées, composées de 3 à 5 sépales, elles se présentent sous forme de grappe, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles et sont très aromatiques (AIT SAID, 2011 ; FERRADJI, 2011).

Les fleurs mâles étant pourvues de 5 étamines, produisant environ 47.103 à 6.103 grains de pollen par fleur. Elles sont regroupées en inflorescence de 8 à 10 fleurs et sont rouge foncé (JORDANO, 1989 ; MORE ET WHITE, 2005). Les fleurs femelles possèdent un ovaire à trois carpelles uniloculaires, avec un ovule anatrope uniovulé, surmonté d'un style court à 3 stigmates et sont vert jaunâtre (GRUNDWAY, 1976 ; AIT SAID, 2011). Elles sont regroupées en inflorescence de 4 à 21 fleurs.

Le fruit est une drupe de 3 à 4 mm de diamètre, de forme ovoïde- globuleux et peu compressé (GRUNDWAY, 1976 ; AIT SAID, 2011). Il est de couleur rouge au début puis devient noirâtre à maturité à la fin de la saison hivernale (VERDU et GARCIA-FAYOS, 1998 ; MORE et WHITE, 2005).

L'écorce est rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Lorsqu'on incise l'écorce de cet arbuste, il fait écouler un suc résineux nommé mastic d'où l'appellation d'arbre à mastic. Une fois distillé, le mastic fournit une gomme à odeur prononcée très utilisée.

Souvent, une part des fruits du lentisque, à l'instar de toutes les autres espèces du genre *Pistacia*, sont vides soit par avortement des embryons ou par parthénocarpie, variable

en fonction des conditions climatiques (GRUNDWAG 1976, JORDANO, 1989 ; VERDU et GARCIA-FAYOS, 1998 ; ÖZEKER *et al.*, 2006 in AIT SAID, 2011).

Les images de certains caractères botaniques de cette espèce sont rapportées dans la **figure 2**.

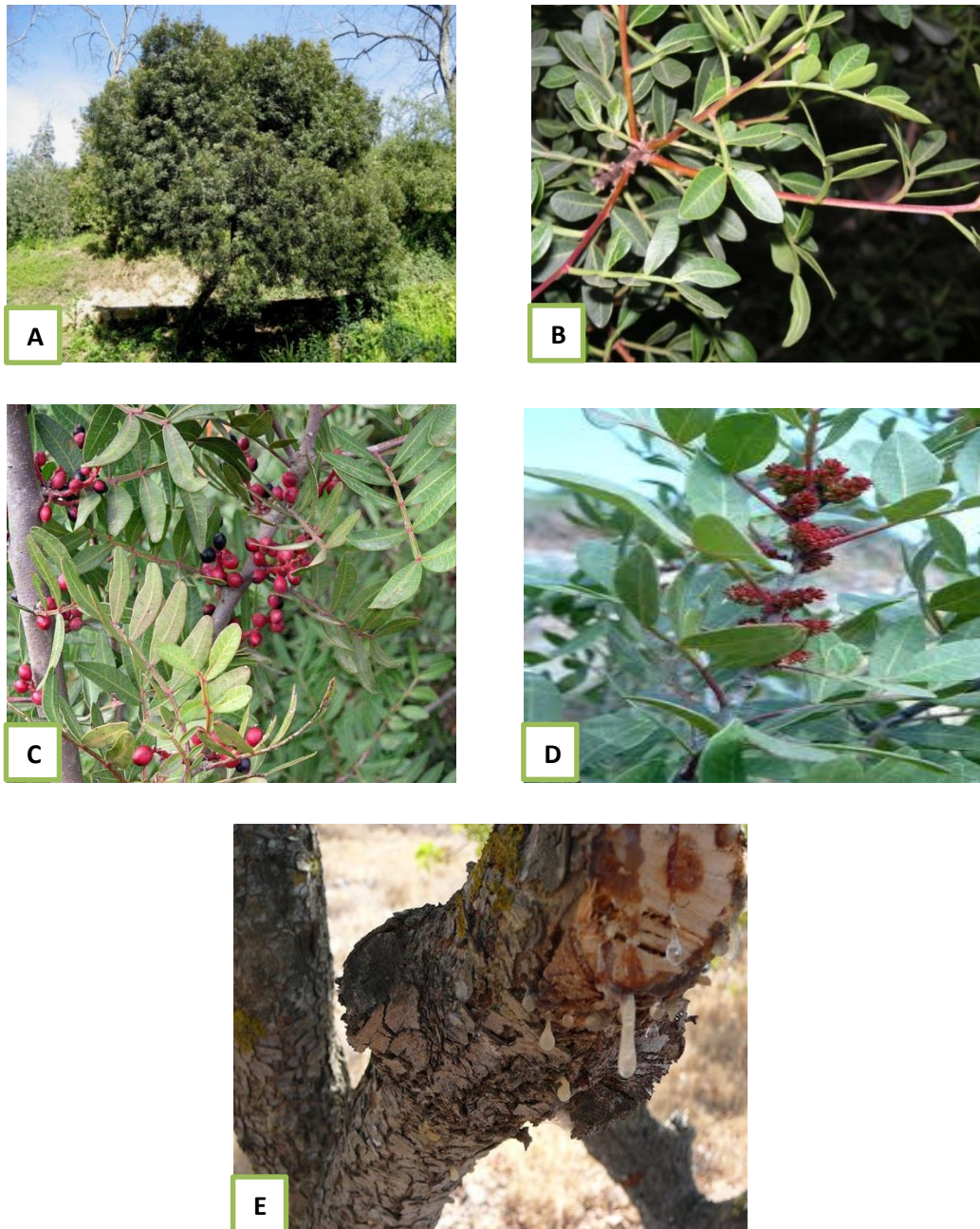


Figure 2 : Quelques caractères botaniques de *Pistacia lentiscus*. **A** : Arbuste, **B** : Feuilles, **C** : Fruit en stade de maturation, **D** : Fleurs mâles, **E** : Ecorce avec résine (Site Google images)

4. Caractère écologiques :

C'est une espèce indifférente aux propriétés physico-chimiques du sol mais préfère des sols à faible concentration en phosphore et potassium conjugués avec des concentrations différentes en carbonates de calcium et en azote (DOGAN *et al.*, 2003). De part son houppier composées de branches imbriquées et denses, le lentisque assure la protection du sol et crée les conditions favorables pour l'humidification de la matière organique et l'enrichissement de ses propriétés biologiques (DIAZ BARRADAS et CORREIA, 1999).

Pistacia lentiscus est présent à l'état spontané sous diverses conditions pédoclimatiques (ABOUSALIM et KALLI, 1998). Les variantes thermiques sont chaude à fraîche et les substrats sont de type marneux ou argileux (BENABID, 2000).

Une étude portant sur la variabilité naturelle de *Pistacia lentiscus* du bassin méditerranéen, utilisant une analyse par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), combinée à des examens chimiques et morphologiques, conclue à l'existence d'une grande variabilité génotypique de cette espèce (BARAZANI, 2002).

Il est parfaitement adapté aux vents, aux embruns et à la sécheresse (BAYER *et al.*, 1990). Sa préférence pour les points chauds et lumineux lui confère un caractère thermophile et une appartenance aux végétaux sclérophylles (QUEZEL et MEDAIL, 2003). Ce qui se traduit par son potentiel élevé à résister aux conditions arides et à la plus part des régions montagneuses.

Cette adaptation à une large fourchette de température permet de déduire que celle-ci conditionne des caractéristiques écologiques majeures telles que la distribution, les taux de survie, la reproduction et la productivité de l'espèce (OUARAB et SEHIL, 2012).

5. Caractères toxicologiques :

L'absence totale des hétérosides cyanogénétiques diminue fortement les risques toxicologiques liés à l'usage de *Pistacia lentiscus* L. (ANDERSEN and MARKHAM, 2010), ce qui est en accord avec les résultats de l'enquête ethnobotanique rapportant que peu d'herboristes sont en faveur d'une toxicité du lentisque (BAMMOU *et al.*, 2015).

Chapitre 2

Composés phytochimiques
biologiquement actifs

Composés phytochimiques biologiquement actifs

Le présent chapitre évalue les composés bioactifs notamment antimicrobiens (**Tableau II**) et antioxydants (**Tableau III**) de *Pistacia lentiscus*. Ces métabolites actifs, dérivés de cette plante, sont utilisés contre diverses maladies infectieuses, dégénératives notamment anticancéreuses (**Tableau IV**), particulièrement associées au stress oxydatif *via* l'accumulation de radicaux libres.

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tels que les polyphénols (**Figure 3**), les terpènes (**Figure 4**) et stérols, les alcaloïdes et qui ne participent pas directement aux processus de base de la cellule vivante.

Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement en l'occurrence la défense contre les infections microbiennes.

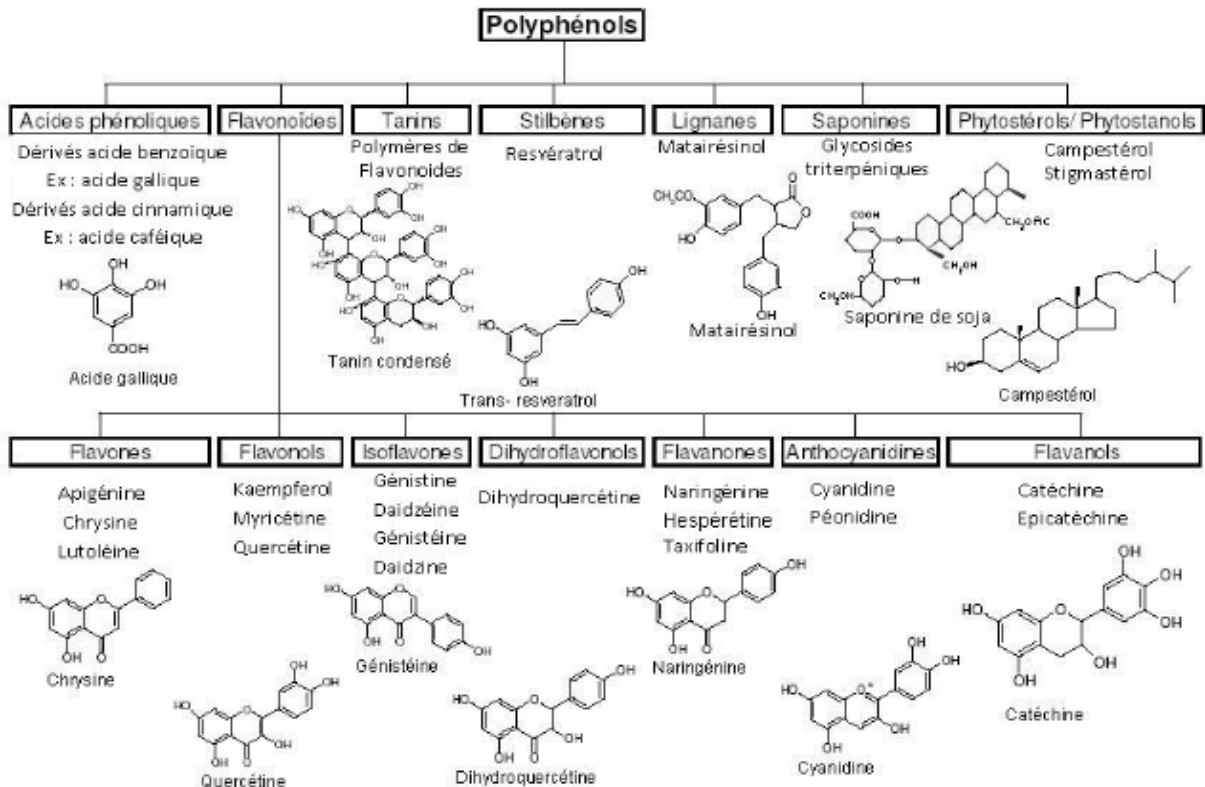


Figure 3 : Différentes classes de composés phénoliques (ADOUANI et REZZAG, 2010)

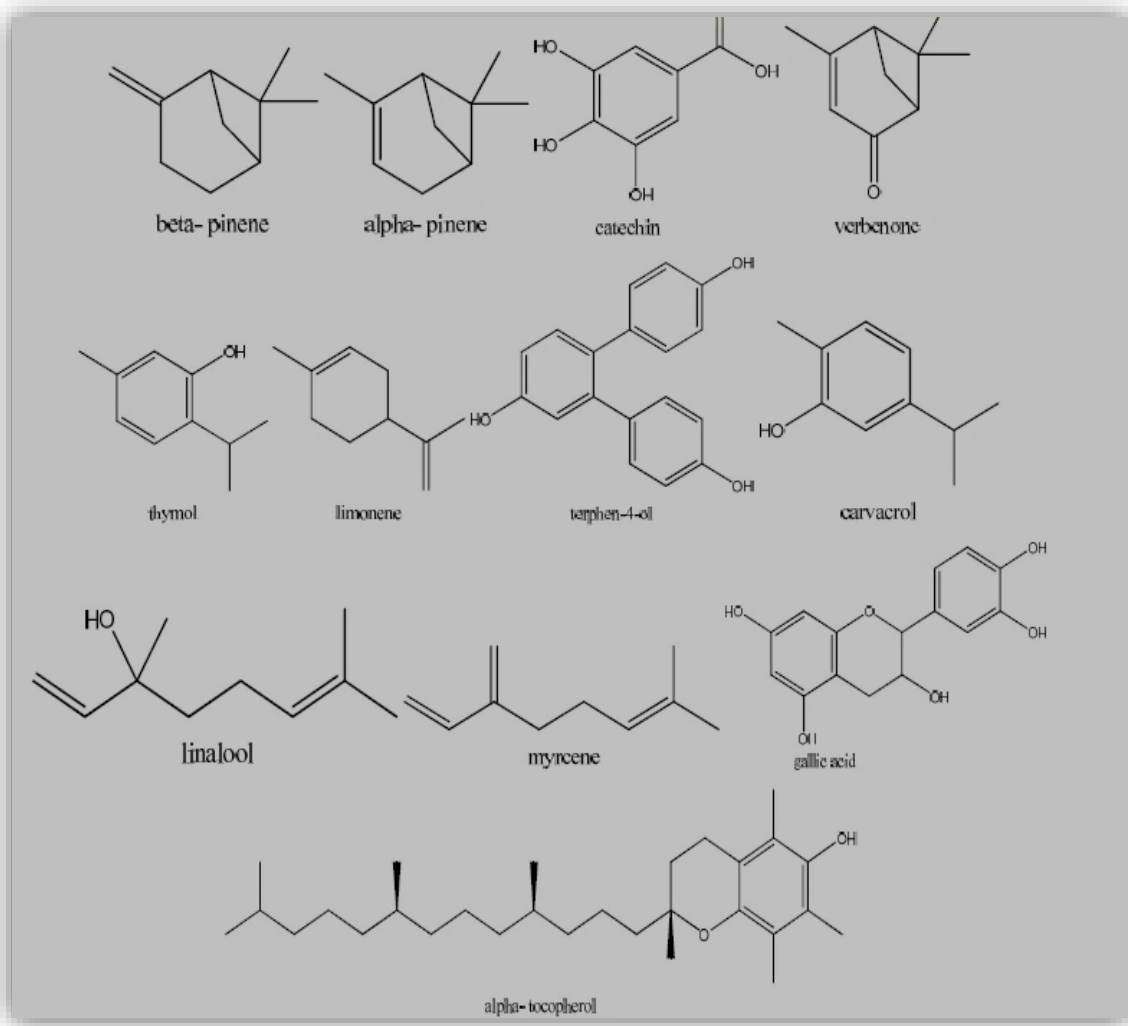


Figure 4 : Structures de certains constituants chimiques importants de *Pistacia lentiscus*

(NAHIDA *et al.*, 2012)

Composés phytochimiques biologiquement actifs

Tableau II : Composés antimicrobiens de *Pistacia lentiscus*

Activité biologique	Composés	Famille de composés	Partie de la plante	Notes	Références	
Activité antimicrobienne	NI	Extrait d'acétone de la gomme de mastic	Résine	Activité antibactérienne plus significative contre <i>Streptococcus mutans Mutans streptococci in vitro</i> et <i>in vivo</i> de sorte qu'il soit utile dans la prévention des caries et de la plaque dentaire	AKSOY <i>et al.</i> , 2006	
		Extrait aqueux enrichi en flavonoïdes. Huile essentielle	Feuille	Effet inhibiteur contre la <i>Salmonella typhimurium</i> et un effet inhibiteur inférieur sur <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Salmonella enteritidis</i>	AKSOY <i>et al.</i> , 2006	
	NI	Extrait aqueux	Feuilles	Antifongique (dermatophytes)	ALI-SHTAYEH et ABU GHDEIB 1999	
			Résine	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcères d'estomac	AL-SAID <i>et al.</i> , 1986, DELAZAR <i>et al.</i> , 2004	
		Terpinéol et le α -terpinéol, β -myrcène et terpin-4-ol	Huile essentielle	Feuilles, branches juvéniles et fleurs	Activité antifongique contre <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Penicillium commune</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> , empêche totalement e la croissance mycélienne d' <i>Aspergillus flavus</i>	BARRA <i>et al.</i> , 2007
		α -pinène (Terpène)	Huile essentielle		L'activité antifongique d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> est due à la haute concentration en α -pinène	BARANOWSKA <i>et al.</i> , 2002
				Résine	Antiseptique du système respiratoire	BAYTOP 1999, <i>in DURUA et al.</i> , 2003
		NI	Huile essentielle	Plante	Activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> et peut être bénéfique dans le traitement de l'ulcère gastroduodéal	BHOURI <i>et al.</i> , 2009 ; ANDRIKOPOULOS 2003

Composés phytochimiques biologiquement actifs

		Les parties aériennes	Aucun ou seulement une faible activité antimicrobienne contre les bactéries Gram (-) et Gram (+)	BONSIGNORE <i>et al</i> 1998 ; TASSOU et NYCHAS, 1995	
	Huile essentielle obtenu par extraction à la vapeur	Feuilles, brindilles et mastic	Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> et une activité antifongique contre <i>Rhizoctania solani</i>	DEDOUSSIS <i>et al.</i> , 2004 ; POOTER <i>et al.</i> , 1991	
		Plante	Efficace contre <i>Sarcina Lutea</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> et il a également une activité antimycotique	DEMO <i>et al.</i> , 1998	
	α -pinène, γ -terpinènes et terpinenes- 4-ol	Huile essentielle	Feuille	Antimicrobien et antimutagène	DOUISSA <i>et al.</i> , 2005
	α - pinène, β -pinène, limonène, α -terpinéol terpinen-4-ol	Huile essentielle	Feuille, résine	Antifongique	DURU <i>et al.</i> , 2003
	NI	Huile du Mastic	Résine	Activité antibactérienne	HEO <i>et al.</i> , 2006 ; KALIORA <i>et al.</i> , 2007
	Extrait brut	Feuilles	Fort pouvoir antifongique mais une faible antibactérienne	KORDALI <i>et al.</i> , 2003	

NI : Non identifié

Composés phytochimiques biologiquement actifs

	Protéine arabino-galactane	Gomme de mastic (CMG)	Résine	Inhibition de <i>Helicobacter pylori</i>	KOTTAKIS <i>et al.</i> , 2008
		Huile essentielle	Plante	Effet antibactérien sur <i>Listeria monocytogenes</i> , combinée avec l'huile essentielle de <i>Satureja montana</i> a mis en évidence l'effet synergique de ces deux plantes contre <i>Listeria monocytogenes</i> pour les viandes hachées conservées au réfrigérateur	DJENANE <i>et al.</i> , 2010
	α -pinène linalol	Huile essentielle	Plante	Activité antifongique d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> est due à l' α -pinène qui se présente en quantité appréciable dans cette huile. Le linalol possède aussi une large gamme d'activité antibactérienne et antifongique	IMELOUANE <i>et al.</i> , 2009
				Activité antifongique semble être beaucoup plus intéressante contre la levure clinique et les champignons pathogènes agricoles	IAUK <i>et al.</i> , 1996 ; KORDALI <i>et al.</i> , 2003
		Huile essentielle	Résine	Très active contre les micro-organismes et les champignons	MAGIATIS <i>et al.</i> , 1999
		Huile essentielle	Feuilles et tiges	Activité modérée contre les bactéries et complètement inactives contre les champignons	

Composés phytochimiques biologiquement actifs

Tableau III : Composés phytochimiques ayant des activités antioxydantes

Activité biologique	Composés	Famille de composés	Partie de la plante	Notes	Références
Activité antioxydante	Acide gallique et 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose	Polyphénols	Fruit	Antimutagène, l'acide digallique a la capacité de piéger le radical libre ABTS (+), ce qui induit d'une part l'inhibition de la xanthine oxydase (XO) impliquée dans la production de radicaux libres et d'autre part l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par H ₂ O ₂ dans la lignée cellulaire K562.	ABDELWAHAB <i>et al.</i> , 2007
	NI	Extrait méthanolique de la résine, CMG	Résine	Anti -LDL <i>in vitro</i>	ANDRIKOPOULOS <i>et al.</i> , 2003
	Monoterpènes	Huile essentielle	Feuilles et tige	Antioxydant	ASSIMOPOULOU <i>et al.</i> , 2005 ; BARRA <i>et al.</i> , 2007
	NI	Phénols de la fraction aqueuse	Feuilles	Fort pouvoir réducteur, une capacité de piégeage très élevé contre le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et une activité remarquable contre la peroxydation de l'acide linoléique	ATMANI <i>et al.</i> , 2009
		Matériel végétal	Feuilles	Cytotoxique	AZAIZEH <i>et al.</i> , 2005
	Triterpènes de résine	Extrait polaire total de la résine	Tige	Activité antiathérogène et antioxydante par l'inhibition de l'effet cytotoxique des ox-LDL : restauration du GSH et régulation négative de l'expression de l'ARNm du récepteur de l'ox-LDL (CD36)	DEDOUSSIS <i>et al.</i> , 2004

ABTS (+) : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) cationique ; K562 : Lignée cellulaire d'érythroleucémie humaine

LDL : Lipoprotéines de basse densité ; ox-LDL : Lipoprotéines de basse densité oxydée ;

GSH : glutathione sulfhydryl ; CD36 : Cluster of differentiation 36 ou Récepteur scavenger

Composés phytochimiques biologiquement actifs

	Mono-terpènes Composés phénoliques	Huile essentielle	Feuille	Forte activité antioxydante au cours du stade de floraison	GARDELI <i>et al.</i> , 2007
	NI	Extrait aqueux bouilli et non bouilli	Feuille	Effet hépato-protecteur, par la réduction d'activité de 3 enzymes ALP, ALT, AST et le niveau de la bilirubine. L'extrait aqueux non bouilli s'est avéré plus efficace que le bouilli	JANAKAT et AL- MERIE, 2002
	Cyanidine 3-O- glucoside, delphinidine 3-O- glucoside et cyanidine 3-O- arabinoside	Anthocyanins	Fruit	Pigment naturel	LANGO <i>et al.</i> , 2007
	Acide Galloyl quinic	Extrait aqueux	Feuilles	Supprime la peroxydation lipidique induite par le fer dans l'homogénat de foie de rat. Diminue fortement l'oxydation des LDL	LJUBUNCIC <i>et al.</i> , 2005
	Xantophyll, luteine, neoxanthine, ascorbate, β- carotène, α- tocophérol	Caroténoïdes, vitamine	Feuille	Antioxydant	MUNNE-BOSCH et PENUELAS, 2003
	NI	Polyphénols	Feuille	Antioxydant	TATTINI <i>et al.</i> , 2006
	NI	Poudre de gomme de mastic	Mastic	Potentiels hépato -protecteur et cardio- protecteur <i>in vivo</i> chez les humains	TRIANAFYLLOU <i>et al.</i> , 2007

ALP : Phosphatase alcaline ; ALT : Alanine aminotransférase ; AST : Aspartate aminotransférase

Composés phytochimiques biologiquement actifs

Tableau IV : Composés phytochimiques ayant des activités anticancéreuses

Activité biologique	Composés	Famille de composés	Partie de la plante	Notes	Références
Activités anticancéreuses	Dérivé dihydrocoumarine	Phénols	Feuille	Brevet non déposé	AKIYAMA et NISHIMURA, 2000
	Terpènes/ Terpénoïdes	Oléorésine	Résine	Activité antimicrobienne, antifongique, anti cancer, antioxydant, piégeage des radicaux libres	ASSIMOPOULOU et PAPAGEORGIU, 2007
	Extrait éthanolique	CMG	Résine	Inhibe la prolifération et induit in vitro la mort de cellules HCT116 du cancer du côlon humain. Elle induit l'apoptose directement ou indirectement par l'arrêt de la division cellulaire à la phase G ₁ suivie par une détérioration de l'ADN.	BALAN <i>et al.</i> , 2007
	Extrait à l'hexane	CMG	Résine	Induction apoptotique Utilisé dans le traitement de tumeurs colorectales	BALAN <i>et al.</i> , 2005 ; DIMAS <i>et al.</i> , 2009
	NI	Huile essentielle	Résine	Activité antimicrobienne, anti prolifération des cellules tumorales	FOTINOS <i>et al.</i> , 2003
	NI	Huile essentielle	Résine	Inhibe la prolifération des cellules LNCaP (lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine sensible à l'androgène)	HE <i>et al.</i> , 2006

HCT116 : Lignée cellulaire de cancer du côlon humain ; G1 : Growth 1

Composés phytochimiques biologiquement actifs

Tableau V : Autres activités des composés phytochimiques de *Pistacia lentiscus*

Activité biologique	Composés	Famille de composés	Partie de la plante	Notes	Références
Activité anti-inflammatoire	NI	Huile de mastic	Résine	Efficace chez des patients présentant la maladie de Crohn	HEO <i>et al.</i> , 2006 ; KOLIORA <i>et al.</i> , 2007
Activité antiarthritique et antigoutteuse	Composés phénoliques	Fraction aqueuse dans l'hexane et le chloroforme	Graines et feuilles	Utilisé dans plusieurs maladies inflammatoires telles que le rhumatisme, l'arthrite et la goutte. Le contenu phénolique total des graines et des feuilles de cette plante ont été estimées. Inhibe la XO, d'où son utilisation dans le traitement de la goutte.	BERBOUCHA <i>et al.</i> , 2009
Activité de guérison des plaies		Huile des fruits gras	Fruit, fraction insaponifiable	Utiliser pour le traitement des plaies	BALAN KV, <i>et al.</i> , 2007
		Fraction insaponifiable d'huile	Plante	Guérison de la plaie.	BOULEBDA <i>et al.</i> , 2009
Activité Hypertension			Résine	Agent thérapeutique contre divers dysfonctionnements gastriques, tels que gastralgies, la dyspepsie et l'ulcère gastrique	AL-SAID <i>et al.</i> , 1986
			Parties aériennes	traditionnellement été utilisé dans le traitement de l'hypertension et possède des propriétés stimulantes et diurétiques.	BENTLEY <i>et al.</i> , 1980
			Ecorce, parties aériennes	Utilisée pour le traitement de l'hypertension dans certaines régions d'Espagne	RANT <i>et al.</i> , 1990
			Résine	Contre l'hypertension	VILLAR <i>et al.</i> , 1987

Partie
expérimentale

Chapitre 1
Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Le lentisque est une plante autochtone reconnue pour ces diverses vertus thérapeutiques notamment pour ses effets antibactériens.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'activité antibactérienne d'extraits aqueux, aqueux assisté par sonication, éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus*. A cet effet nous avons déterminé cette activité par la méthode de diffusion par disque et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

1. Matériel :

1.1. Matériel végétal :

1.1.1. Choix de la plante et de la partie de la plante utilisée :

Le choix de *Pistacia lentiscus* est basé sur une enquête ethno- pharmacologique auprès de la population locale ayant une connaissance de son usage en médecine traditionnelle. De plus , il apparait que tous les herboristes recommandent l'utilisation des feuilles du fait qu'elles sont le siège de la photosynthèse et le lieu de stockage des métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante (BIGENDAKO-POLYGENIS et LEJOLY , 1990).

1.1.2. Situation géographique :

Nous avons échantillonné des feuilles de *Pistacia lentiscus* en fin février dans la région de Timizart-Loghbar de la wilaya de Tizi-Ouzou (**Figure 5**). Cette station se trouve au centre - Nord de l'Algérie, les coordonnées géographiques étant de 36°40'51.96" pour la latitude et de 4°19'35.4" pour la longitude. Nous avons récolté les feuilles sur un seul pied, notons le fait que le lentisque en question est entouré d'oliviers.



Figure 5 : Site géographique de la région de la récolte de l'échantillon (site Google Earth)

🎯 : Timizart- Loghbar

1.1.3. La récolte du matériel :

Les feuilles récoltées sont d'abord lavées triées puis séchées à l'ombre à température ambiante (25°C) pendant 18 jours, jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. 142 g de feuilles sont ensuite finement broyées à l'aide d'un moulin à café, puis conservées à l'obscurité afin d'éviter les photo-oxydations, jusqu'à leur utilisation.



Figure 6 : Feuilles de *Pistacia lentiscus* après séchage.

1.2. Souches bactériennes testées :

Pour tester l'activité antibactérienne des extraits des feuilles du lentisque, nous avons opté pour sept souches bactériennes de référence :

- Gram négatives :

Escherichia coli, ATCC25922,

Citrobacter freundii ATTC8090

Klebsiella pneumoniae, ATTC4352

Pseudomonas aeruginosa, ATCC27853,

- Gram positives :

Bacillus cereus, ATCC10876

Enterococcus faecalis, ATTC49452

Staphylococcus aureus, ATCC43300

1.2.1. Choix des bactéries :

Nous nous sommes intéressées à ces bactéries car elles sont potentiellement pathogènes, il s'agit de germes capables d'infecter un large spectre d'hôtes et de causer diverses pathologies.

1.2.2. Milieux de culture utilisés :

- Revivification :

Bouillon nutritif BHIB

- Isolement :

Milieu Chapman

Milieu BCP

Milieu BEA

Gélose nutritive GN

- Milieux de cultures :

Gélose Mueller Hinton

Bouillon Mueller Hinton

2. Méthodes :

2.1. Préparation des extraits :

La préparation des différents extraits (**Figure 7**) a été effectuée le même jour à partir de la poudre obtenue.

2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux (EA) :

25 g de poudre du lentisque sont ajoutées à 100 ml d'eau distillée, ce mélange est suivi d'une agitation sur un agitateur magnétique pendant 30 mn, puis porté à ébullition sur une plaque chauffante à 90 °C pendant 15 mn.

2.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique (EE) :

25 g de poudre sont ajoutées à 70 ml d'éthanol, que l'on complète avec 30 ml d'eau distillée en vue d'obtenir un solvant d'extraction à 70 %, le mélange est suivi d'une agitation sur un agitateur magnétique pendant 30 mn.

2.1.3. Préparation de l'extrait aqueux assisté par un sonicateur (ES):

25 g de poudre sont ajoutées à 100 ml d'eau distillée, le mélange est directement mis dans le sonicateur de fréquence 35 kHz pendant 30 mn.

On fait suivre une étape de filtration sur un papier wattman N°1 pour ces différents extraits, les filtrats sont récupérés dans des cristallisoirs étiquetés que l'on porte à l'étuve à 40 °C pendant 72 h puis on effectue des pesées successives jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. Les extraits sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Matériel et méthodes

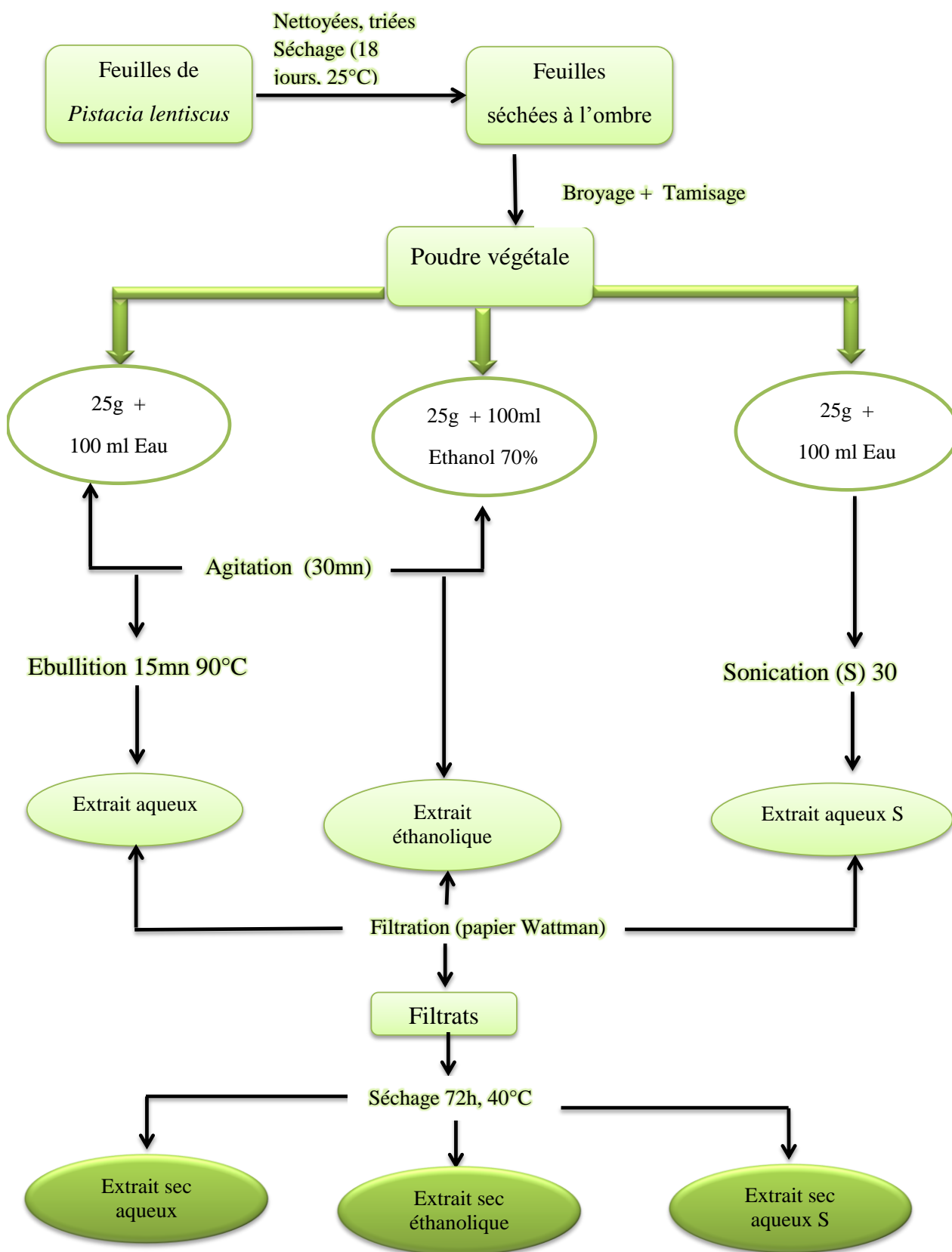


Figure 7 : Schéma récapitulatif des étapes des extractions

2.2. Identification des souches testées :

Les bactéries testées étant des souches de références, conservées dans des cryotubes, une identification préalable sur des milieux de cultures suivis d'une coloration de Gram, a été effectuée en vue de s'assurer de leur pureté.

2.2.1. Revivification :

A partir des tubes de conservation, les souches ont été prélevées, à l'aide d'un écouvillon, dans des tubes contenant le milieu BHIB préalablement étiqueté.

2.2.2. Isolement :

La purification pour chacune des souches, se fait par l'ensemencement en stries par la méthode des cadrans sur des milieux de culture, suivi d'une incubation pendant 24 h à 37°C.

Milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*.

Gélose nutritive pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Milieu BCP pour *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*

2.2.3. Coloration et observation :

A partir de chaque milieu préalablement ensemencé et incubé, on prélève une colonie et on réalise un frottis en vue d'effectuer une coloration de Gram ; celle-ci permet de diviser le monde bactérien en deux groupes distincts et d'apprécier la pureté des souches bactériennes, sous microscope optique, avant toute identification (DELARRAS, 2007).

2.3. Détermination du pouvoir antibactérien :

2.3.1. Méthode de diffusion par disque :

2.3.1.1. Préparation de l'inoculum et ensemencement :

Les cultures bactériennes préalablement ensemencées sur milieu gélosé Mueller Hinton ont été mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile (0.9%). La turbidité de l'inoculum correspondant à une DO comprise entre 0.08 et 0.10 (HERNANDEZ *et al.*, 2000 ; GREISIELE *et al.*, 2003) est ensuite standardisée à 10^7 UFC/ml.

2.3.1.2. Préparation des extraits à tester :

0.5g de chaque extrait de plante a été dissous dans 1 ml de DMSO (1%) favorisant la diffusion de l'extrait.

2.3.1.3. Technique de diffusion sur milieu gélosé :

Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu solide qui consiste en la détermination des diamètres des zones d'inhibition (**Figure 8**) (GUPTA *et al.*, 2010 ; GULLUCE *et al.*, 2003). Des disques stériles, de 6mm de diamètre découpés sur papier Wattman N°1, sont déposés à la surface de la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencé en nappe. Les extraits sont ensuite déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques à raison de 20 µl. Un disque imbibé de DMSO est utilisé comme contrôle négatif et comme contrôle positif la Pénicilline G de référence P10 IU. Lot 112013020 Liofilchen s.r.l. Roseto (TE) Italy.

Chaque test a été répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation et on procède à la moyenne.

Après 24 h d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition en mm, formées autour des disques ont été mesurées à l'aide d'une règle.

2.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Dans un premier temps on procède à une dilution successive à partir de la solution mère (0.08 g/ml) , de chaque extrait de *Pistacia lentiscus* dans de l'eau physiologique , par progression géométrique à raison de 2 de façon à obtenir successivement les dilutions 1/2 , 1/4, 1/8 , 1/16 , 1/32 , 1/64, 1/128 (OUSSOU *et al.*, 2004) .

La macrométhode de dilution dans un milieu liquide (**Figure 9**) a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des extraits actifs. Dans chaque cryotube on met 700µl de bouillon Muller Hinton auquel on ajoute 250µl de l'extrait et 50µl de la suspension fixée à une DO comprise entre 0.08 et 0.10 , selon la standardisation de

Matériel et méthodes

l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 2011, puis standardisée à 10^7 UFC/ml .

Etant donné que l'extrait a une densité optique qui pourrait fausser les résultats lors de la lecture, on fait un blanc pour chaque concentration afin de soustraire sa valeur lors de la lecture de la DO et d'en déduire ainsi uniquement la valeur de la DO relative au développement bactérien.

Afin d'éliminer les erreurs dues à un mauvais ensemencement ou de la qualité du milieu de culture, on réalise un témoin négatif où l'on met 700 μ l du bouillon MH et 300 μ l d'eau physiologique (à 0,9%) et un témoin positif qui contient 700 μ l du bouillon MH et 250 μ l d'eau physiologique (à 0,9%) auxquels on ajoute 50 μ l de la suspension bactérienne.

On réalise trois répétitions pour chaque concentration d'extrait.

Matériel et méthodes

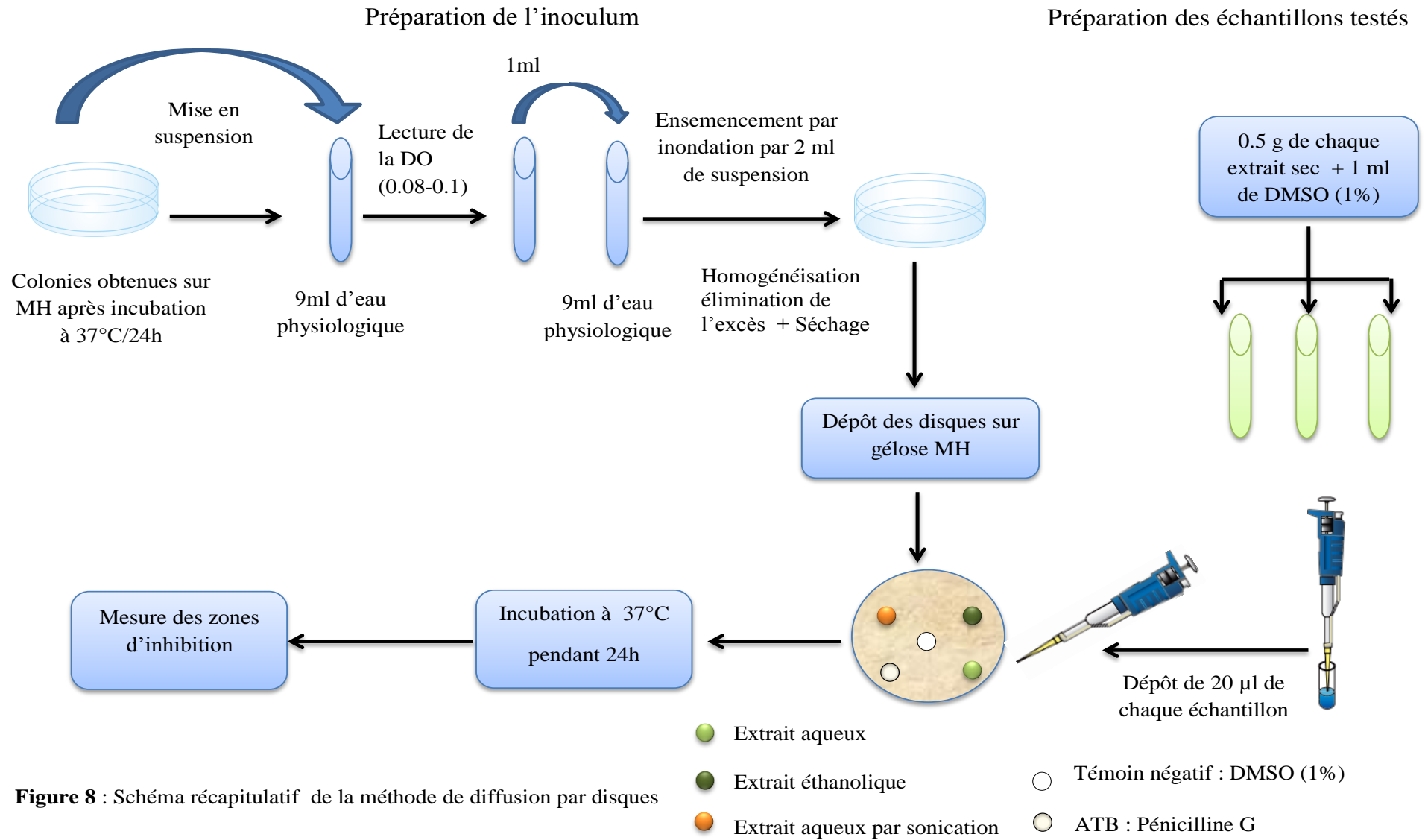


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques

Matériel et méthodes

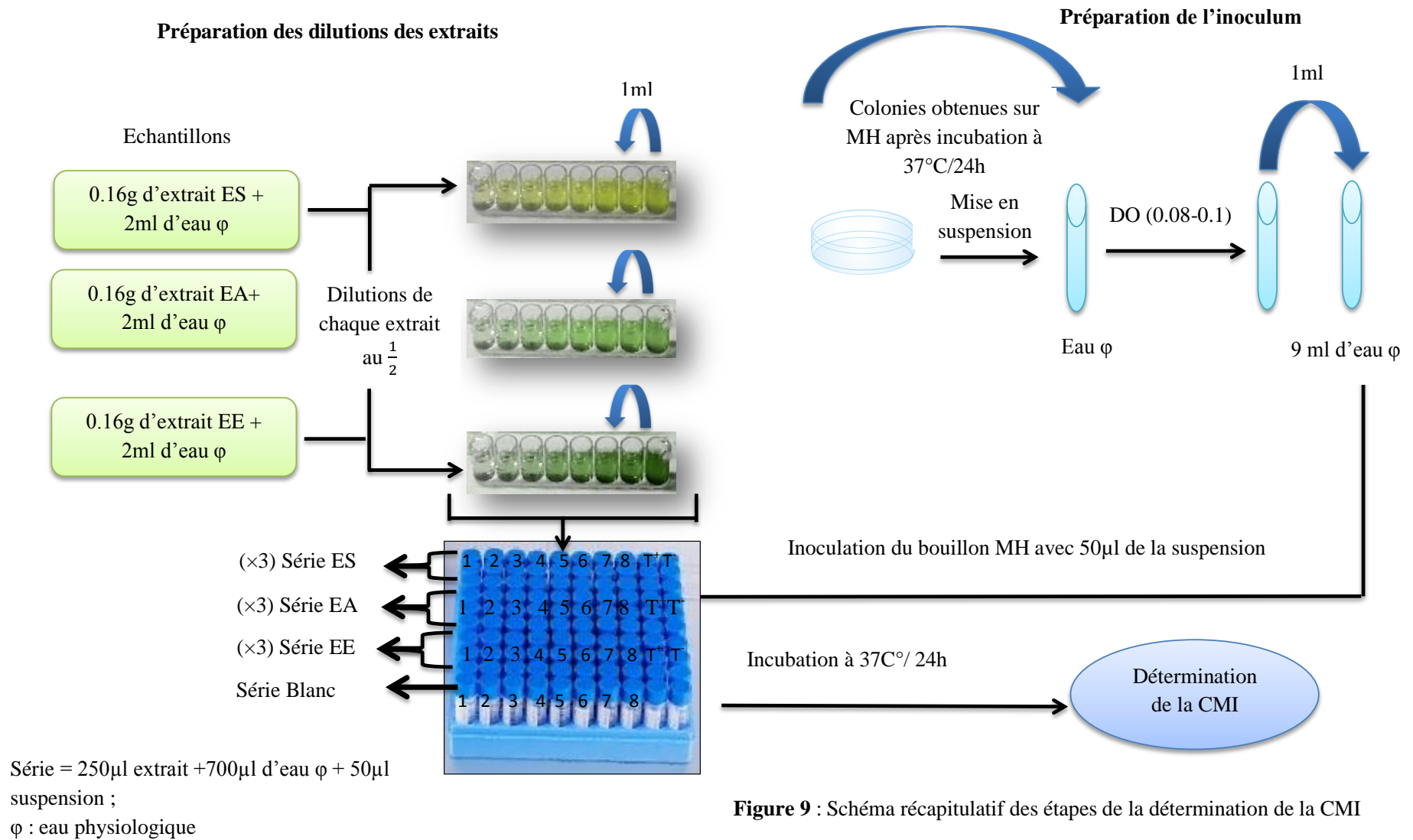


Figure 9 : Schéma récapitulatif des étapes de la détermination de la CMI

Chapitre 2

Résultats et discussion

1. Rendement :

Après chaque extraction, le filtrat est évaporé à sec jusqu'à obtention d'un poids constant, et le résidu obtenu est pesé. Le rendement, exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel de départ, est déterminé par la relation suivante :

$$R = \frac{Pe}{Pv} \times 100$$

Avec:

R : Rendement des extraits en %

Pe : Poids de l'extrait en g

Pv : Poids du matériel végétal en g

Tableau VI : Rendements des différentes extractions exprimées en %.

Extraits	Aqueux	Ethanolique	Aqueux assisté par sonication
Rendements %	15,2%	21,6%	9,2%

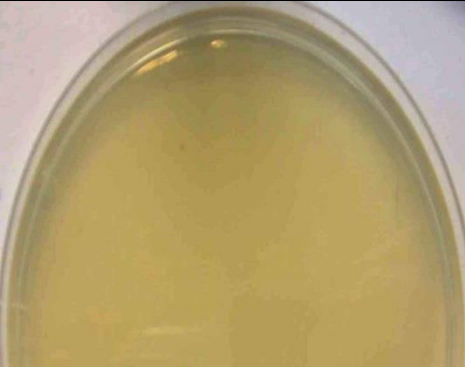

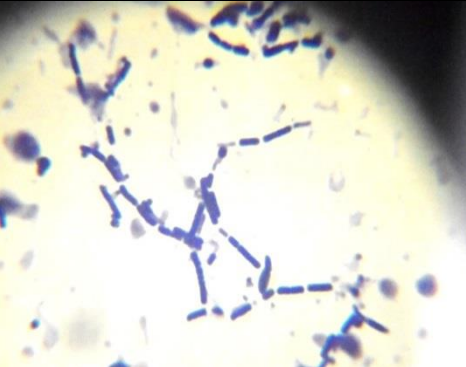

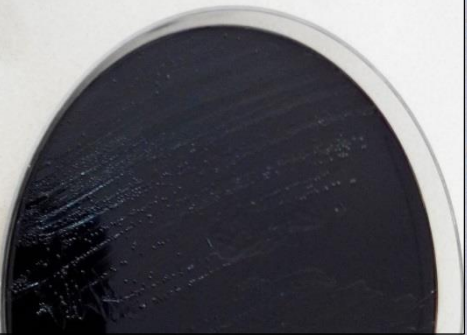
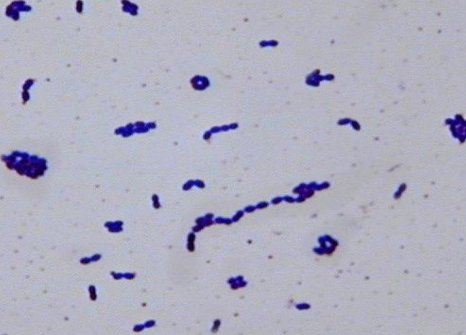
Les rendements obtenus à partir des feuilles pour les extraits aqueux, éthanolique et aqueux assisté par sonication, sont respectivement de 15.2%, 21.6% et 9.2 %. Les raisons de cette variabilité peuvent être expliquées par la différence des méthodes d'extractions et des solvants utilisés. En effet, le volume du solvant utilisé, le temps de macération, l'agitation, le traitement thermique sont autant de paramètres qui influencent les rendements d'extraction. Par ailleurs, ces différences dans le protocole d'extraction rendent difficile la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs.

Résultats et discussion


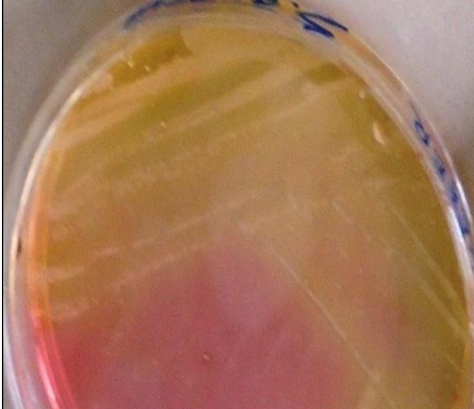
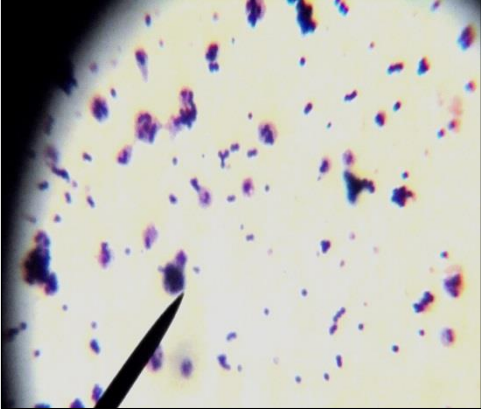
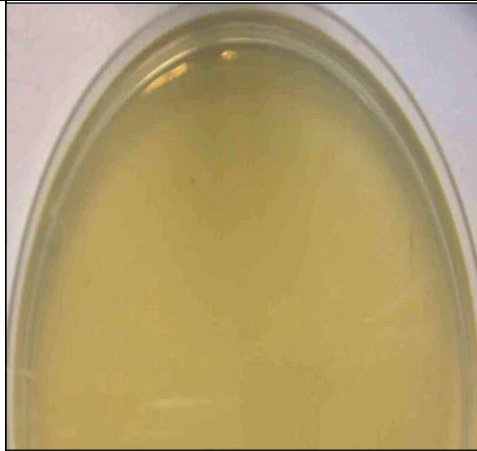
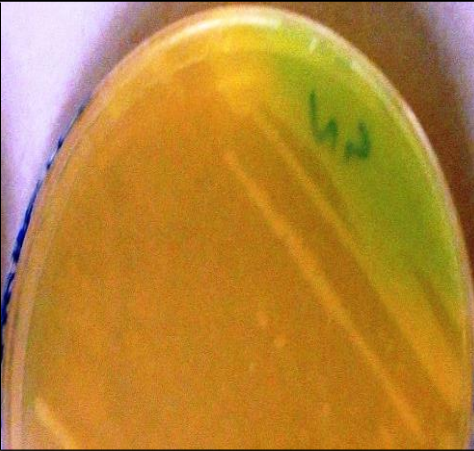

2. Résultats de l'identification :

Après isolement sur les différents milieux de culture, une coloration de Gram suivie d'une observation sous microscope optique ($G \times 1000$) ont été effectués afin d'apprécier la pureté des différentes souches bactériennes testées. Les résultats de cette identification sont consignés dans le **tableau VII**.


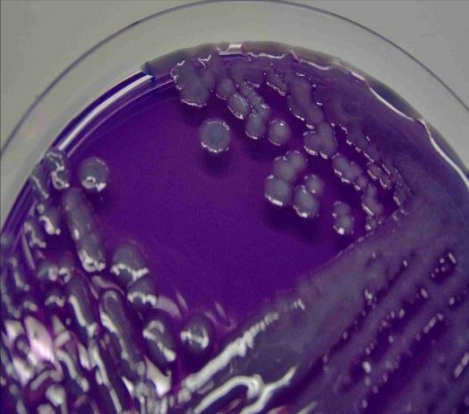
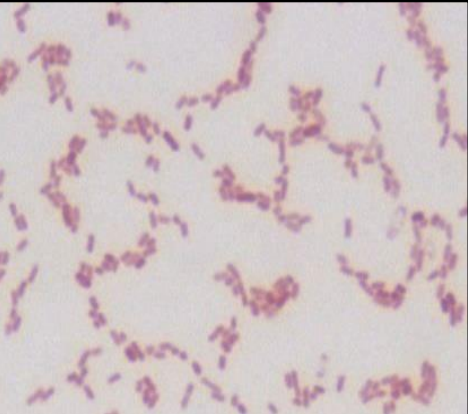

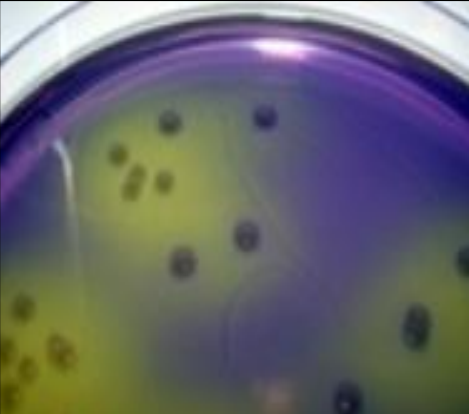

Tableau VII: Résultats de l'identification microbiologique des souches bactériennes testées

Souche bactérienne	Milieu avant incubation	Milieu après incubation	Coloration de Gram
<i>Bacillus cereus</i>			
	Gélose nutritive	Colonies larges avec des coins arrondis	Bacilles droits à Gram positif avec des bouts arrondis $G \times 1000$
<i>Enterococcus faecalis</i>			
	Milieu BEA	Petites, transparentes, blanchâtres	Cocci Gram positif isolés en paire ou en chaînette $G \times 1000$


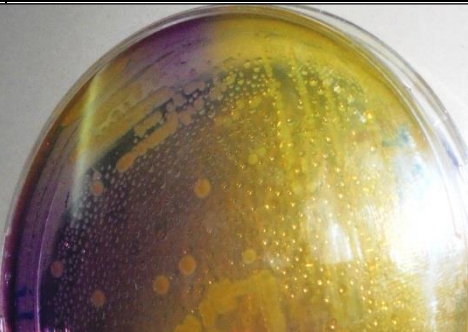
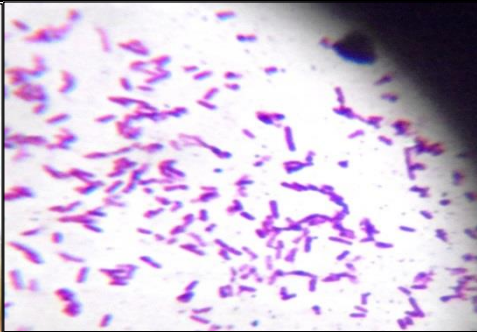
Résultats et discussion

souches	Milieu avant ensemencement	Milieu après incubation	Coloration de Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Milieu Chapman	Colonies rondes, lisses, opaque, virage du milieu au jaune par acidification du milieu	Coques arrondis à Gram positif souvent en amas G×1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	Gélose nutritive	Colonies petites, mâtes, bombées à contour régulier à pyocyanine	Bacilles à Gram négatif très fin G×1000

Résultats et discussion

Souches	Milieu avant ensemencement	Milieu après incubation	Coloration de Gram
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Milieu BCP	Grosses, épaisses, opaques, bombées, muqueuse	Bacilles à Gram négatif isolés G×1000
<i>Citrobacter freundii</i>			
	Milieu BCP	Lisses, légèrement convexes, à contours réguliers	Bacilles à Gram négatif isolé o en paire G×1000

Résultats et discussion

souche	Milieu avant encensement	Milieu après incubation	Coloration de Gram
<i>Escherichia coli</i>			
	Milieu BCP	Colonies arrondies, à bord réguliers et lisses, virage du milieu au jaune par acidification du milieu	Bacilles à Gram négatif isolé ou en chaînette G×1000

Résultats et discussion

Résultats de l'identification d'*Escherichia coli* :

Lors de la réalisation de la coloration de Gram d'*Escherichia coli*, nous avons suspecté la présence de bacilles, ce pourquoi nous avons réalisé une galerie biochimique classique (**Figure 10**).Après incubation à 37°C pendant 24 h nous avons confirmé la pureté de cette souche (**Figure 11**).Les résultats de cette identification sont rapportés dans le **tableau VIII**.



Figure 10: Galerie biochimique d'*Escherichia coli* avant incubation



Figure 11: Galerie biochimique d'*Escherichia coli* après incubation 37°C/24

1 : Milieu TSI, 2 : Milieu Citrate de Simmons, 3 : Milieu mannitol mobilité,
4 : Bouillon nitrate, 5 : Milieu Clark et Lubs, 6 : Eau peptonée exempte d'indole
7 : Milieu urée indole

Tableau VIII : Résultats de la galerie biochimique d'*Escherichia coli*

Test	glucose	lactose	Citrate	Mannitol	Indole	NR	Mobilité
Résultats	+	+	-	+	+	+	-

+ : Réaction positive, - : Réaction négative

Résultats et discussion

3. Détermination de l'activité antibactérienne :

3.1. Détermination des zones d'inhibition :

L'activité antibactérienne des différents extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis des souches bactériennes testées à savoir les Gram positifs : *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et les Gram négatifs : *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches suscitées (**Tableau IX**) varient de 0 à $20,333 \pm 6,350$ selon la souche et les types d'extrait testés.

Tableau IX: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque extrait des feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Diamètres des zones en mm					
Différents extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>					
	EE	ES	EA	ATB	CN
<i>Bacillus cereus</i>	$13,333 \pm 0,577$	$17,333 \pm 0,577$	$18,666 \pm 1,154$	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$12,333 \pm 0,577$	17 ± 0	$18,666 \pm 1,154$	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	$20,333 \pm 6,350$	$16 \pm 1,527$	$17,666 \pm 1,527$	13 ± 1	0

Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart-type (trois répétitions) EE : extrait éthanolique ; ES : extrait aqueux par sonication ; EA : extrait aqueux, ATB : Pénicilline G comme contrôle positif ; CN (Contrôle négatif) : DMSO (1%)

3.2. L'analyse statistique des zones d'inhibition :

La normalité des valeurs des zones d'inhibition est vérifiée avec le test Kolmogorov-Smirnov pour les trois bactéries ayant présentées des zones d'inhibitions. Comme les données sont gaussiennes, on utilise l'ANOVA comme test statistique par le logiciel Statbox6 afin de savoir si les trois extraits ont le même effet inhibiteur sur chacune de ces bactéries ou non.

Bacillus cereus :

PPROBA=0.0007 cette p-value étant très inférieure à la valeur d'alpha ($\alpha = 0.05$), il y a donc une différence significative de l'effet inhibiteur des trois extraits sur *Bacilles cereus*. On poursuit notre test statistique par le test de NEWMAN KEULS qui classe les extraits en deux groupes homogènes : les extraits aqueux et sonicateur sont classés dans un même groupe, avec des moyennes respectives de 18,667 et 17,333. Ayant un moindre effet sur *Bacillus cereus*, l'extrait éthanolique est classé dans un autre groupe avec une moyenne de 13,333.

Pseudomonas aeruginosa :

PPROBA=0,001, la p-value étant inférieure à la valeur d'alpha ($\alpha= 0.05$), il y a donc une différence significative de l'effet inhibiteur des trois extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*. On poursuit l'analyse avec le test de NEWMAN KEUL qui classe respectivement les extraits EA, ES et EE par ordre décroissant des moyennes soient : 18.667, 16.333 et 12.333.

Staphylococcus aureus :

PPROBA=0.555, la p-value étant supérieure à la valeur de alpha ($\alpha= 0.05$), il n y a donc pas de différence significative de l'effet inhibiteur des trois types d'extrait sur *Staphylococcus aureus*.

Résultats et discussion

4. Détermination de la CMI :

4.1. Détermination de la CMI par la mesure de la DO :

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices des différents extraits sur chacune des souches ayant présentées une sensibilité (Tableau X) à savoir *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été déterminées par lecture au spectrophotomètre à 620 nm.

Tableau X : Résultats des CMI par la mesure de la DO à 620 nm

Concentrations g/ml	<i>Bacillus cereus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	EE	ES	EA	EE	ES	EA	EE	ES	EA
0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	0,0273±0,041	0	0,210±0,110	0	0	0	0	0	0
0.005	0,55±0,010	0,158±0,097	0,314±0,060	0	0	0	0,046±0,023	0,089±0,004	0,073±0,002
0.0025	0,648±0,037	0,165±0,093	0,454±0,094	0,062±0,034	0,07±0,050	0,03±0,032	0,100±0,055	0,18±0,012	0,016±0,018
0.00125	0,636±0,027	0,284±0,174	0,524±0,098	0,094±0,010	0,111±0,008	0,061±0,018	0,631±0,120	0,595±0,370	0,734±0,057
0.000625	0,593±0,028	0,35±0,124	0,621±0,036	0,072±0,039	0,126±0,002	0,075±0,007	0,752±0,280	0,734±0,237	0,745±0,063
T+	0,292±0,053	0,372±0	0,337±0,067	0,365±0,058	0,398±0,102	0,333±0,043	0,729±0,192	0,612±0,053	0,831±0,071
T-	0,108±0,012	0,11±0,197	0,095±0,110	0,017±0,001	0,050±0,019	0,015±0,01	0,011±0,010	0,104±0,148	0,012±0,001

Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart-type (trois répétitions) EE : extrait éthanolique ; ES : extrait aqueux par sonication ; EA : extrait aqueux

4.2 Courbes représentant les résultats de la mesure de la densité optique :

Les valeurs des densités optiques de *Bacillus cereus* en fonction des concentrations des trois extraits (**Figure 12**) sont traduites par les courbes suivantes par le logiciel Excel version 2007.

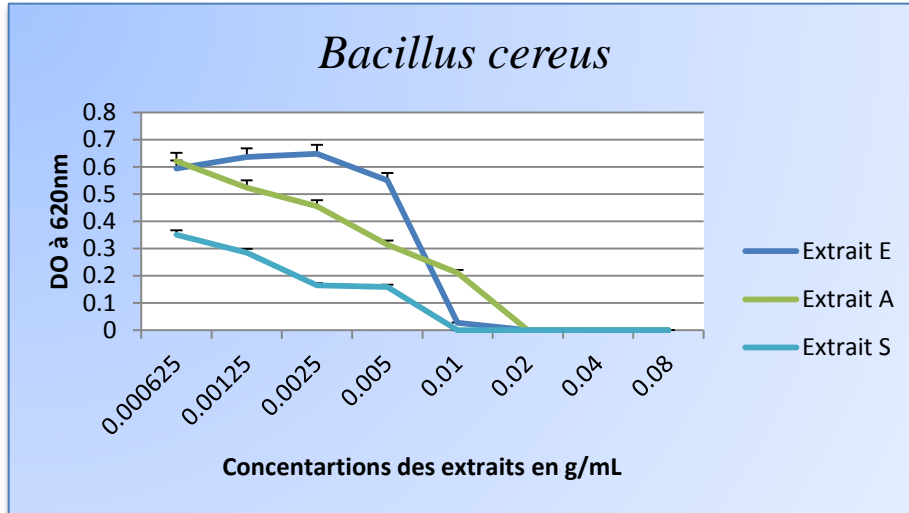


Figure 12 : Courbe représentant la DO de *Bacillus cereus* en fonction des différentes concentrations d'extraits

Les valeurs des densités optiques de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des concentrations des trois extraits (**Figure 13**) sont traduites par les courbes suivantes par le logiciel Excel version 2007.

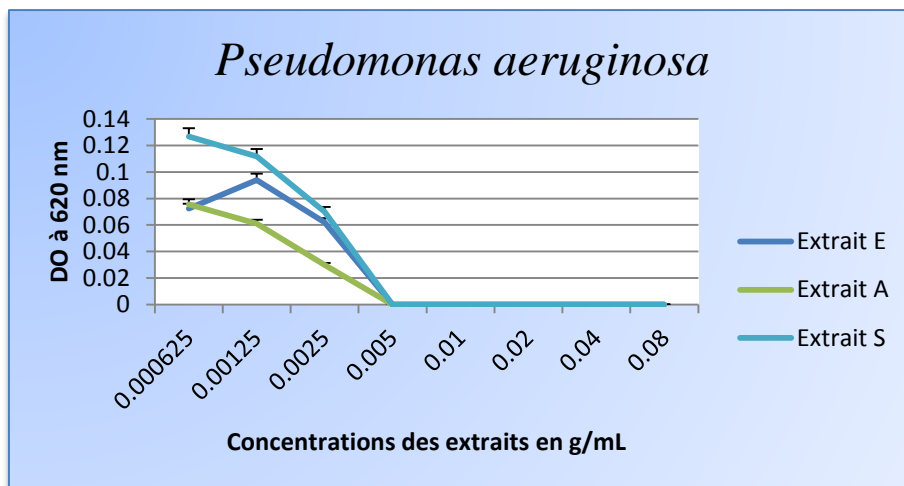


Figure 13 : Courbe représentant la DO de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des différentes concentrations d'extraits

Les valeurs des densités optiques de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des concentrations des trois extraits (**Figure 14**) sont traduites par les courbes suivantes par le logiciel Excel version 2007.

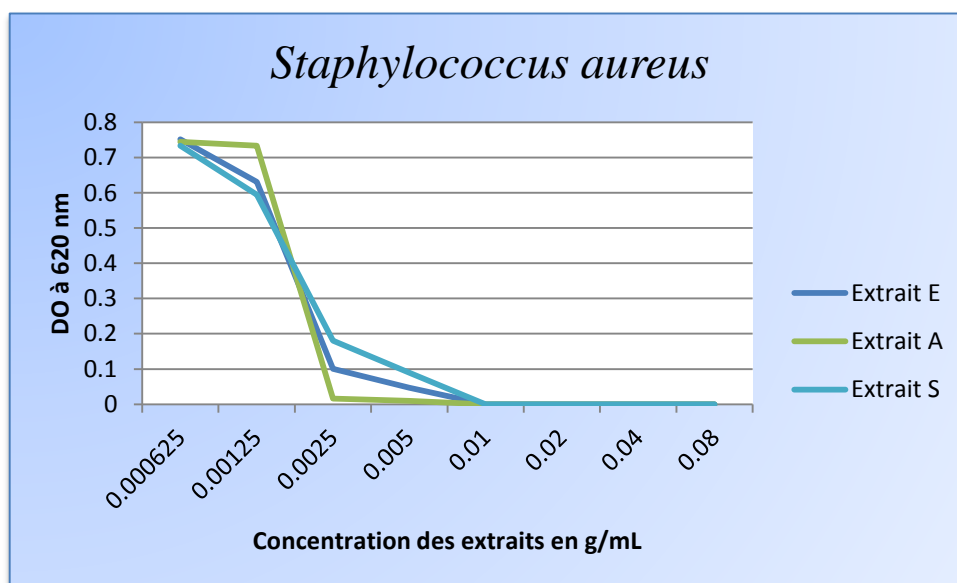


Figure 14: Courbe représentant la DO de *Staphylococcus aureus* en fonction des différentes concentrations d'extraits

Soient : E : extrait éthanolique ; A : extrait aqueux ; S : extrait aqueux par sonication

4.2. Analyse statistique de la densité optique des CMI :

Le test de normalité de Kolmogorov-Smirnov nous montre que les DO des CMI des trois souches *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que *Staphylococcus aureus* ne sont pas gaussiennes selon leur P-value respectives de 6.73×10^{-5} ; 4.97×10^{-10} et 3.13×10^{-6} . Par conséquent on utilise un test d'analyse des variances non paramétrique qui est le test de Kruskal-Wallis par le logiciel Statbox 6. Les valeurs des p-value de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* étant respectivement de 0.08, 0.58 et 0.28, on en déduit qu'elles sont supérieures à la valeur d'alpha ($\alpha=0.05$), par conséquent le type d'extrait n'influence pas sur l'effet inhibiteur.

5. Effets des extraits sur les souches testées :

Le noircissement des zones d'inhibition obtenues par les différents extraits de *Pistacia lentiscus* pourraient être due à une partie des tannins qui s'est irrévérablement combinée à d'autres polymères à cause de l'utilisation de feuilles sèches et notamment le non recours à la lyophilisation qui aurait débarrassé la solution aqueuse de ses pigments (BRUNETON, 2009). D'autre part Croteau *et al* 2000 ont montré qu'une rapide oxydation des phénols pourraient induire le brunissement de l'extrait végétal.

Par ailleurs, BENDIFALLAH *et al* (2014) ont obtenu des zones similaires des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

- Effet des extraits sur *Escherichia coli* :

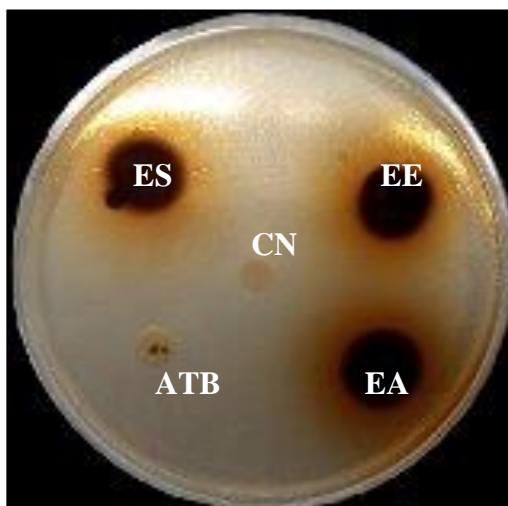


Figure 15 : Antibiogramme d'*Escherichia coli*

Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue avec les différents extraits testés *in vitro*, vis-à-vis d'*Escherichia coli*, de même que pour l'antibiotique (pénicilline G) ayant servi de contrôle positif.

BAMMOU *et al* (2015) ont trouvé une résistance d'*E.coli* vis-à-vis d'extraits méthanoliques à 70% de feuilles de *Pistacia lentiscus*. Le méthanol est un solvant dont l'indice de polarité est proche de celui de l'éthanol, soient respectivement 5.1 et 5.2 (SADEK, 2002). On pourrait croire dans un premier temps, qu'*E.coli* semble résistante aux composés solubles dans les solvants polaires, et dans notre cas l'éthanol à 70%.

Résultats et discussion

Nos résultats, sont également semblables à ceux trouvés par BENHAMMOU *et al* (2008). En effet ces derniers ont obtenu l'absence totale de zone d'inhibition vis-à-vis d'*Escherichia coli*, d'un extrait éthanolique de feuilles de lentisque, séchées à l'ombre à température ambiante. La préparation diffère de la nôtre par l'utilisation de l'éthanol à 96%, une macération durant 15 jours et d'une filtration suivie de l'évaporation de la solution éthanolique sous pression à 70°C par un rotavapeur.

D'après ces mêmes auteurs, l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont connues pour être riches en composés phénoliques. Leur analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à l'UV (ultra-violets) a permis l'identification de flavonoïdes, d'acides phénoliques, des flavones, d'anthocyanines, d'acide gallique et d'acide *para*-coumarique. Par corrélation avec les résultats de BENHAMMOU *et al* (2008), on pourrait suggérer qu'*E.coli* présente une résistance à ces métabolites secondaires.

Cependant OUARAB et SEHIL (2012) ont obtenu vis-à-vis d'*Escherichia coli*, des diamètres de zones d'inhibition variant de 14 à 20 mm avec des extraits éthanoliques de feuilles de *Pistacia lentiscus*, de concentrations respectives 0.378 g/ml et 0.551g/ml. Il est important de noter qu'il s'agit d'une extraction éthanolique à 100% suivi d'une filtration, d'un traitement par rotavapeur et qu'ensuite l'extrait végétal, exempt d'éthanol, a subi une microfiltration (0.2µm de diamètre) pour enfin avoir été conservé au congélateur à -18°C.

Si l'on confronte les résultats trouvés par BENHAMMOU *et al* (2008) avec ceux d'OUARAB et SEHIL (2012), on note que les solvants d'éthanol utilisés sont respectivement de 96% et de 100%, soit une différence de 4% qui n'est probablement pas à l'origine de la dissemblance des deux résultats, de même pour les nôtres.

On suppose donc que le seul paramètre d'extraction ayant influencé sur la résistance d'*Escherichia coli* se trouve être la conservation de l'extrait éthanolique à - 18°C. Par analogie à la lyophilisation, ce mode de conservation pourrait avoir maintenu un niveau plus élevé en composés phénoliques (DAI et MUMPER, 2010), que ceux ne l'ayant pas subi, en l'occurrence notre extraction. Cette hypothèse est étayée par les travaux d'IAUK *et al* (1996) qui ont obtenu une sensibilité vis-à-vis d'*Escherichia coli* appréciable par une CMI de 0.0025g/mL avec un extrait éthanolique de feuilles séchées de *Pistacia lentiscus* préalablement lyophilisé. Leur protocole d'extraction est selon les règles de la pharmacopée officielle.

Résultats et discussion

Effets de l'extrait aqueux et de l'extrait aqueux assisté par sonication :

Nos résultats concordent avec ceux de BAMMOU *et al* 2015 qui ont trouvé une résistance d'*E coli* vis-à-vis du décocté préparé selon la méthode de SQALLI *et al* 2007, soit 10 g de poudre d'extrait de feuilles du lentisque mélangé dans 100 ml d'eau bouillante porté à ébullition pendant 15 mn. Notons quelques différences dans la préparation de notre décocté, soient 25g de poudre d'extrait dans 100ml d'eau portée à ébullition pendant 30 mn.

L'extrait aqueux assisté par sonication correspond à une macération proprement dite, suivie d'un traitement par ultrasons, il semblerait que cette extraction ne s'est pas démarquée des précédentes vis-à-vis de notre souche.

IAUCK *et al* (1996) ont cependant trouvés une sensibilité d'*E.coli* avec des CMI de 312 mg/ml et 1250 mg/ml respectivement pour les extraits de décoction et de macération. Ce qui atteste de l'importance de la lyophilisation.

- Effet des extraits sur *Citrobacter freundii* :

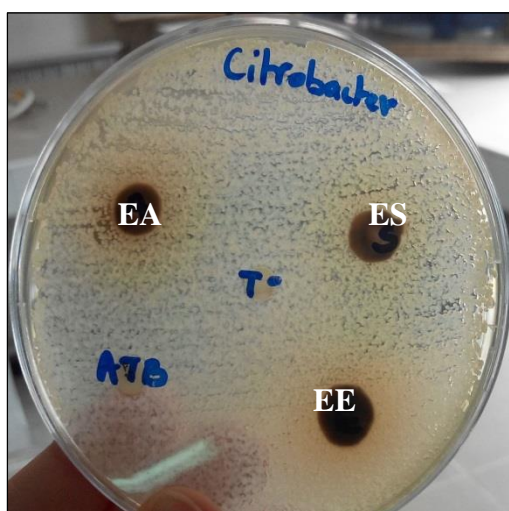


Figure 16 : Antibiogramme de *Citrobacter freundii*

Aucune zone d'inhibition n'a été trouvée vis-à-vis de *Citrobacter freundii* par les trois extraits.

Aucune étude n'a été retrouvée dans la bibliographie concernant l'activité antibactérienne de *P. lentiscus* vis-à-vis de cette souche, nous confronterons alors nos

Résultats et discussion

résultats à l'activité d'une autre plante, *Rhus coriaria*, communément appelée Sumac, de la famille des Anacardiacees.

L'extraction éthanolique à 97% des fruits mûrs et non mûrs de *Rhus coriaria* réalisée par RAYNE et MAZZA (2007), a révélé une sensibilité de *Citrobacter freundii* appréciable par une CMI de 0.001g/mL. De plus il apparait que les fruits mûrs ont une meilleure activité antibactérienne.

Une activité vis-à vis *Citrobacter freundii* a aussi déterminée par une extraction aqueuse (1h à 25°C suivie d'une ébullition pendant 2 mn) des fruits séchés de *Rhus coriaria*.

Il apparait que dans l'extrait aqueux les fruits mûrs et non mûrs ont une efficacité antibactérienne similaire contrairement à l'extraction éthanolique, cette différence est d'ailleurs rencontrée dans plusieurs groupes bactériens. Par ailleurs, ABBAS *et al* 2007 ont trouvé que les extraits aqueux des fruits de *Rhus coriaria* sont moins actif vis-à vis des Gram négatifs

- Effet des extraits sur *Klebsiella pneumoniae* :

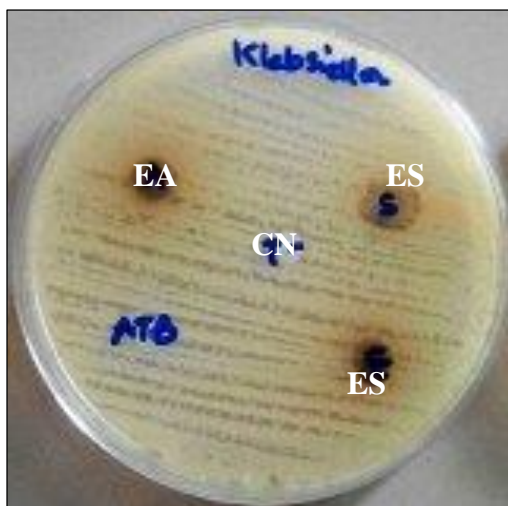


Figure 17 : Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*

Il apparait que *Klebsiella pneumoniae* ne présente aucune sensibilité pour les trois types d'extrait des feuilles du lentisque.

Résultats et discussion

L'activité de l'extrait éthanolique, riche en composés phénoliques, des feuilles séchées de BENHAMMOU *et al* (2008) n'a eu aucun effet sur *Klebsiella pneumoniae*, de même pour l'extrait méthanolique de BAMMOU *et al*(2015).

BENDIFALLAH *et al* (2014) ont réalisé une extraction méthanolique des polyphénols des feuilles du lentisque (30g dans 100 ml de méthanol) ainsi qu'une extraction des tannins par de l'acétone. Ces deux extraits se sont révélés inefficaces sur *Klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition de 2.0 ± 0.58 et 0 respectivement pour les polyphénols et les tannins.

En ce qui concerne l'effet de notre extrait aqueux sur cette souche, des résultats similaires ont été observés chez BAMMOU *et al* (2015) pour son décocté réalisé selon la méthode de SQALLI *et al* (2007).

On suppose donc que cette souche ne présente aucune sensibilité envers les composés solubles dans les solvants polaires à savoir les polyphénols et les tannins.

- Effet des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa* :

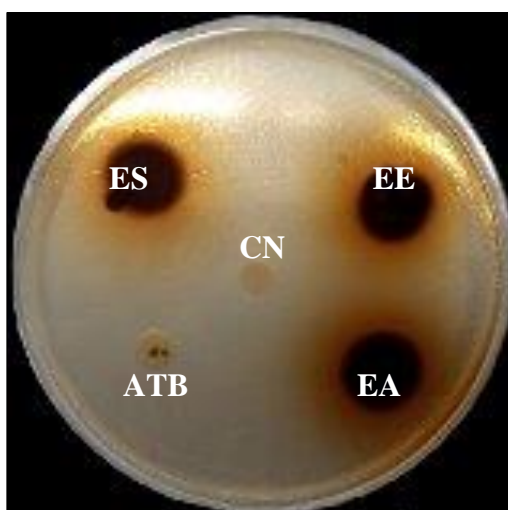


Figure 18 : Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est la seule bactérie Gram négative à avoir montré une sensibilité vis-à-vis des trois extraits. Avec la méthode de diffusion par disque, les valeurs des zones d'inhibition sont de 18.666 ± 1.154 , 17 ± 0 et 12.333 ± 0.577 mm respectivement pour les extraits EA, ES et EE.

Résultats et discussion

Cependant l'analyse statistique atteste qu'il n'y a pas de différence significative de l'effet inhibiteur des trois extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui pourrait être due à des teneurs très proches en composés phénoliques de ces trois extraits.

La zone d'inhibition de l'extrait EE se rapproche de celle de BENHAMMOU *et al* (2008) portant sur l'activité antibactérienne *in vitro* d'un extrait éthanolique (10 μ l) avec une zone d'inhibition de 14.5 mm.

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* de BOUHARB *et al* (2014) ont révélé que les extraits aqueux sont plus actifs que les extraits éthanoliques. Les souches pigmentées (pyocyanine) sont plus résistantes aux extraits que les souches non pigmentées. De plus, l'eau a été le meilleur solvant dans la concentration des principes actifs des plantes.

Cependant seule une activité de l'extrait éthanolique a été trouvée (12.66 \pm 0.477 mm), cette valeur étant proche de la nôtre (12.333 \pm 0.577 mm). L'absence totale d'activité de leur extrait aqueux pourrait être due à l'extraction de la poudre végétale par chaleur à reflux pendant 2 heures dans l'eau. En effet l'ouverture du vase à réaction, empêchant la surpression, pourrait être à l'origine de pertes des composés phytochimiques antimicrobiens.

Par ailleurs, l'extrait aqueux d'*Eucalyptus gomphocephala* s'est avéré le plus actif sur toutes les souches étudiées, avec des zones d'inhibition entre 16 et 18.5 mm, et des valeurs de CMI entre 6.25 et 12.5 mg/mL.

DERWICH *et al* (2010) ont obtenu une modeste zone d'inhibition (10 mm) avec l'huile essentielle des feuilles du lentisque. Ils considèrent qu'elle présente une faible sensibilité vis-à-vis de cette huile riche en monoterpènes, comparée à *Escherichia coli* (34 mm) et *Staphylococcus aureus* (14 mm) et *Enterococcus faecalis* (23 mm). Ces auteurs considèrent que les monoterpènes, les terpènes paraissent avoir des propriétés antibactériennes de forte à modéré. Cela s'explique par leur capacité à former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes cibles par les groupes hydroxyles des phénols et à travers le C₁₀ et le C₁₅ des terpènes à noyau aromatique.

- Effet des extraits sur *Enterococcus faecalis* :

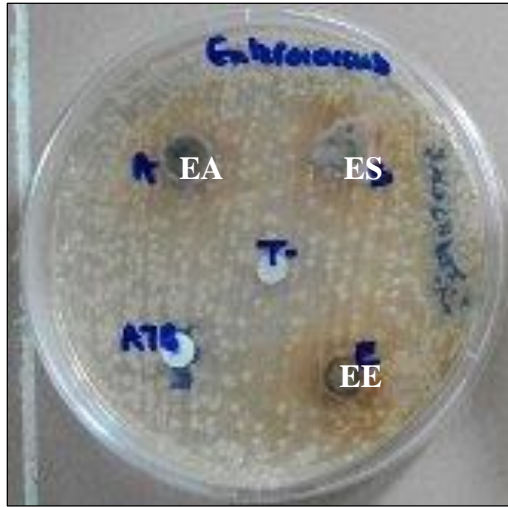


Figure 19 : Antibiogramme d'*Enterococcus faecalis*

Il apparaît qu'*Enterococcus faecalis* ne présente aucune sensibilité pour les trois types d'extrait des feuilles du lentisque.

ABID (2009) ont montré que l'extraction méthanolique à 70 % (ou extrait brut) des flavonoïdes et des polyphénols totaux, des feuilles de *Pistacia vera* n'ont pas d'activité antibactérienne à l'égard d'*Enterococcus faecalis*.

DERWICH *et al* (2010) ont montré que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* présentait une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis* avec une zone d'inhibition de 23mm de diamètre et une CMI de 0.0006g /mL. Ces auteurs considèrent que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles du lentisque est due aux terpènes notamment les α -pinène et les β -pinène.

- Effet des extraits sur *Bacillus cereus* :

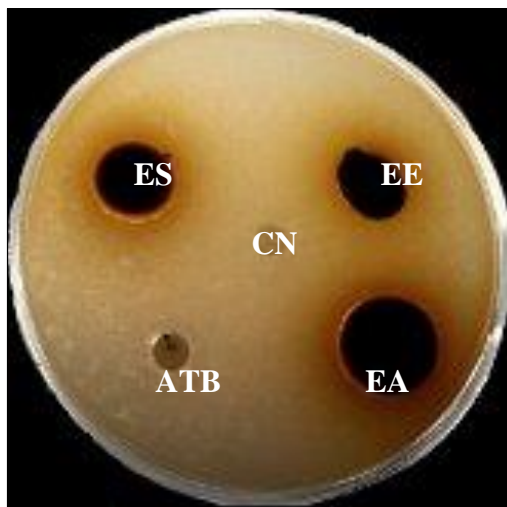


Figure 20: Antibiogramme de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus a montré une sensibilité avec des zones d'inhibition de $18,666 \pm 1.154$, $17,333 \pm 0.577$ et $13,333 \pm 0.577$ mm respectivement pour les extraits EA, ES et EE.

Il s'avère que les extractions par l'eau (EA et ES) sont plus efficaces que l'extraction éthanolique, cela peut être expliqué par la différence de polarité entre l'eau et l'éthanol. L'eau étant plus polaire, elle conduit donc à une meilleure extraction des composés phénoliques responsables de l'activité antibactérienne.

Par ailleurs RAYNE et MAZZA (2007) ont attribué l'activité antibactérienne des fruits de *Rhus coriaria* (Anacardiaceae) vis-à-vis de *Bacillus cereus* aux tannins, solubles dans les solvants polaires.

Ces mêmes auteurs ont trouvé une activité antibactérienne, de l'extrait éthanolique à 97% des fruits de *Rhus coriaria*, appréciable par une CMI de 0.0005g/mL.

- Effet des extraits sur *Staphylococcus aureus* :

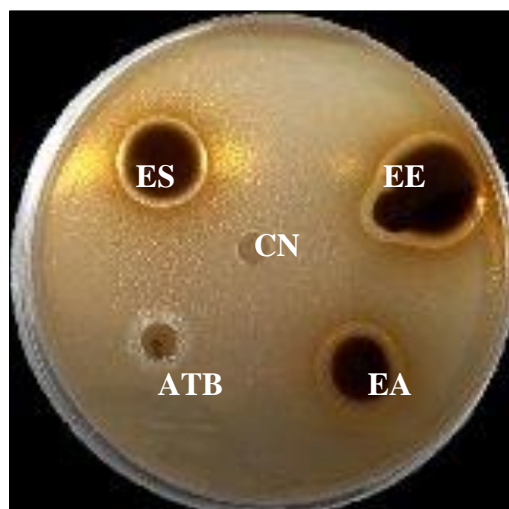


Figure 21 : Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus a montré une sensibilité avec des zones d'inhibition de $20,333 \pm 6,350$, $17,666 \pm 1,527$ et $16 \pm 1,527$ mm respectivement pour les extraits EE, EA et ES. Notons le fait que cette souche soit la seule qui présente une nette résistance à la pénicilline G avec un halo d'inhibition de 13 ± 1 mm.

Nos résultats concordent avec ceux d'IAUCK *et al* (1996) qui ont obtenu une sensibilité des différents extraits (éthanolique, décoction et macération) de feuilles séchées de *Pistacia lentiscus* préalablement lyophilisés. Leur protocole d'extraction est selon les règles de la pharmacopée officielle. La sensibilité trouvée pour *Staphylococcus aureus* est appréciable par des valeurs de CMI de 0.0003, 0.0012 et 0.0025 g/mL respectivement pour la décoction, macération et éthanolique.

BENHAMMOU *et al* (2008) ont trouvé une zone d'inhibition de 21.5 mm (10 μ l) par l'extrait éthanolique des feuilles séchées de *P. lentiscus*.

BENDIFALLAH *et al* (2014) ont trouvé que l'extraction méthanolique (des polyphénols) des feuilles du lentisque, présente une activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 17 ± 3.54 mm, cette zone est très proche de celle trouvée par l'extrait EA ($17,666 \pm 1,527$ mm). Notre extrait éthanolique a donné une meilleure

Résultats et discussion

zone d'inhibition de $20,333 \pm 6,350$ mm, cela pourrait être due à la différence d'indice de polarité des deux solvants, 5.1 et 5.2 respectivement pour le méthanol et l'éthanol.

L'extraction par l'acétone des tannins galliques par BENDIFALLAH et al (2014), a révélé une zone d'inhibition de 9 ± 1.15 mm. On pourrait expliquer cette différence de sensibilité vis-à-vis des deux extractions, par une plus grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux composés phénoliques qu'aux tannins galliques.

L'effet des différents extraits sur les souches testées met en évidence l'influence de la nature du solvant d'extraction sur l'activité antibactérienne. Les différents extraits bruts testés, obtenus par extraction à l'eau et à l'éthanol (solvants de polarité très proche), se traduisent chez *S. aureus* par l'absence de différence significative de leurs effets inhibiteurs.

Cependant, des variations des effets inhibiteurs de ces mêmes extraits sont rencontrées chez *P. aeruginosa* et *Bacillus cereus* suggérant qu'une meilleure teneur en principes actifs est extractible par l'eau que par l'éthanol.

Avec la méthode de diffusion par disque, les extraits se sont révélés être efficaces uniquement contre la gram-négative *Pseudomonas aeruginosa* et contre les gram-positives *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (**Tableau VIII**)

La concentration minimale inhibitrice (CMI), est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait dans laquelle il y a absence de développement bactérien (**Tableau IX**). Les trois extraits ont donné des valeurs de CMI de 0.005 et 0.001 g/mL respectivement pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. En ce qui concerne *Bacillus cereus* une CMI de 0.02 g/mL est enregistrée pour les extraits EE et EA et une CMI de 0.01 g/mL pour l'extrait ES. C'est ainsi que l'analyse statistique a conclu à l'absence de différence significative entre les extraits sur leurs effets inhibiteurs.

Dans cette présente étude les gram-négatifs tels que *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, et *Klebsiella pneumoniae* se sont montrés résistants aux extraits de *Pistacia lentiscus* à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré des zones d'inhibitions de $18,666 \pm 1,154$, 17 ± 0 and $12,333 \pm 0,577$ mm respectivement pour les extraits EA, ES et EE.

Cependant, à l'exception d'*Enterococcus faecalis* qui n'a montré aucune sensibilité, les extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* se sont avérés plus actifs vis-à-vis des gram-

Résultats et discussion

positifs tels que *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec des zones maximales d'inhibition de 18.666 ± 1.154 , $20,333 \pm 6,350$ mm, respectivement.

Cette différence de sensibilité entre Gram+ et Gram- est probablement associée à leurs structures membranaires. Les bactéries à Gram négatifs sont généralement plus résistantes à cause de la réduction de la perméabilité de leur membrane externe entourant la paroi cellulaire. En effet cette membrane externe de nature polysaccharidique favorise la résistance aux agents antimicrobiens hydrophobes (SHAN *et al.*, 2007).

Par contre les bactéries à Gram positifs, dépourvues de la membrane externe, se laissent facilement traversées par les agents antimicrobiens qui peuvent atteindre ainsi leurs sites d'action. La sensibilité de nos bactéries Gram + vis-à-vis des extraits pourrait être expliquée par l'action destructrice des polyphénols de la membrane plasmique. Leur activité est probablement due à leur capacité se complexer avec des protéines. L'association de ces composés résulte d'une part d'interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques des composés phénoliques et les acides aminés hydrophobes du peptidoglycane. D'autre part ils peuvent établir des liaisons hydrogènes entre leurs groupements hydroxyles et les groupements polaires des protéines (DE REYNAL, 2009). De plus ces agents peuvent induire une coagulation et une fuite du contenu cellulaire via la détérioration de la force motrice des protons et du mouvement des électrons (SHAN *et al.*, 2007) .

Les composés phytochimiques, responsables des activités antibactériennes rencontrées sont principalement des polyphénols en l'occurrence les tannins, les phénols et les flavonoïdes.

L'activité antimicrobienne des tannins serait due à leur capacité à se complexer aux protéines de transport (STERN *et al.*, 1996).

Les phénols simples et les acides phénoliques possèdent des activités antibactérienne (BRANTNER *et al.*, 1996) dont le mécanisme d'action n'est pas bien connu, mais, il pourrait inclure une inhibition enzymatique, probablement à travers une réaction avec les groupes sulfhydryles ou des interactions non-spécifiques avec les protéines. De plus, le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique pourraient être en relation avec leur toxicité relative sur les microorganismes (Cowan, 1999). Une rapide oxydation le rend brun et peut facilement générer des nouveaux produits qui forment un complexe avec les protéines et inhibe l'activité enzymatique des bactéries. (CROTEAU *et al* 2000).

Résultats et discussion

Etant donné que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (COWAN, 1999). Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Mais, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (PRASAD *et al.*, 2004).

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Ce présent travail a eu pour principal but l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des feuilles séchées de *Pistacia lentiscus*, récoltées vers fin février dans la région de Timizart-Loghbar de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Cette évaluation antibactérienne par trois types d'extraits bruts a montré une meilleure sensibilité vis-à-vis des Gram positifs, à l'exception d'*Enterococcus faecalis* qui n'a montré aucune zone d'inhibition. En effet les souches bactériennes à Gram positif représentées par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* se sont montrés sensibles avec des zones d'inhibition de 18.666 ± 1.154 et 20.333 ± 6.350 mm respectivement.

Par opposition les souches à Gram négatifs telles que *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae* se sont caractérisées par une résistance avec l'absence totale de zones d'inhibition. Cependant *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélé sensible et a montré des zones d'inhibitions allant de 18.666 ± 1.154 à 12.333 ± 0.577 mm

Pseudomonas aeruginosa et *Staphylococcus aureus* se sont caractérisées par des valeurs de CMI (identiques pour les 3 extraits) de 0.05 et 0.01 g/mL respectivement. *Bacillus cereus* a révélé d'une part une CMI de 0.01 g/mL pour l'extrait ES et d'autre part une valeur de CMI de 0.02 g/mL pour les extraits EA et EE.

Cependant l'analyse statistique a donné une p-value $> \alpha$ attestant qu'il n'y a pas de différence significative de l'effet inhibiteur des trois types d'extrait.

Par ailleurs, ces valeurs diffèrent en général de celles citées dans la littérature et cela pourrait s'expliquer par la divergence des méthodes d'extraction ainsi qu'à la pureté et au mode de conservation des extraits.

En perspective et pour élargir le champ d'étude des effets biologiques de *Pistacia lentiscus* il serait intéressant de :

- ❖ Optimiser les conditions d'extraction qui représente une étape très importante dans l'évaluation des effets biologiques de plantes médicinales. Pour atteindre cet objectif on doit tester un plus grand éventail de solvants avec différents volumes en variant le temps et la température de la macération ou de la décoction.

Conclusion et perspectives

- ❖ Optimiser les conditions de conservation des extraits afin de réduire les possibilités de développement des réactions d'altérations par des procédés tels que la lyophilisation, le traitement par rotavapeur.
- ❖ il serait intéressant, après avoir évalué *in vitro* l'activité antimicrobienne de la plante, d'envisager d'extraire, d'isoler, de caractériser les principes actifs des composés phytochimiques et de tester directement leurs effets sur divers micro-organismes pathogènes pour une éventuelle application pharmacologique. En effet, l'identification de l'agent actif permet d'entreprendre des études structure-activité, permettant une meilleure application de l'agent antimicrobien, une meilleure formulation des dosages appropriés et peuvent aussi amener à une meilleure compréhension des mécanismes de multi-résistances des germes en cause.
- ❖ étudier les autres parties de la plantes, car la plante entière, appelée aussi « Totum » s'avère plus efficace que la somme de ses composés pris séparément. Le lentisque accumule nombre important de métabolites secondaire au niveau des graines et du mastic, il serait judicieux de se pencher sur leurs effets biologiques.
- ❖ La complexité des extraits, nécessite des techniques de séparation efficaces en vue d'identifier les différentes molécules d'intérêts et ce par des méthodes performantes telles que l'HPLC, la GC, la CCC, la SFC. Les deux premières, couplées à différents systèmes de détection, devraient d'avantage être employées pour l'analyse quantitative et/ou qualitative des différents constituants de la plante.
- ❖ Les facteurs environnementaux influent sur les voies de biosynthèse des composés chimiques et de leur pourcentage, conduisant à une variabilité des chemotypes. Des investigations ultérieures devraient donc être effectuées pour définir le génotype de *Pistacia lentiscus* L.

*Références
bibliographiques*

A

ABBAS M and BOUDRICHE D. (2007). Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pistacia lentiscus* L. et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques.

ABDELWAHED A., BOUHLEL I., SKANDRANI I., VALENTI K., KADRI M., GUIRAUD P., STEIMAN, R., MARIOTTE A-M., GHEDIRA K., LAPORTE F., DIJOUX-FRANCA M-G and CHEKIR-GHEDIRA L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. *Chemico-Biological Interactions* 1651: 1–13.

ABID L. (2009). Recherche des activités antimicrobiennes et antioxydantes de *Schinus molle* L. et *Pistacia vera* L. de la région de Tlemcen. Mémoire Magister. Université Abou Bakr BELKAID. Tlemcen.

ABOU-SALIM A et KALLI. (1998). Délimitation des zones à vocation pistachier au Maroc. *Review Research Améliorer Production Agricole Milieu aride* 4:35-42

ADOUANI et REZZA G. (2010). Extraction de certains composés du miel naturel ayant effet antimicrobien. Mémoire de fin d'études en vue De L'obtention Du Diplôme d'Etudes Supérieures en Biologie option Biochimie. Université KASDI MERBAH – Ouargla.

AIN-LHOUT F., ZUNZUNEGUI M., DIAZ BARRADAS M.C., TRIADO R., CLAVIJO A and GARCIA NOVO F. (2004). Comparaison of accumulation in two Meriterranean shrubs subject to naturel and experimental xater deficit. *Plant and Soil* 230,175-183.

AIT-SAID S. (2011). Stratégies adaptatives de deux espèces du genre *Pistacia* (*P. lentiscus* L. et *P. atlantica* Desf). Aux conditions d'altitude, de salinité et d'aridité : Approches morpho-anatomiques, phytochimiques et écophysologie. Thèse de Docteur en Science Biologique. Université Mouloud MAMERRI de Tizi-Ouzou.

AKIYAMA T., NISHIMURA S., TAKI M., TAKAISHI S., IJIMA Y. (2000). Structure of 4-aryl-coumarin (neoflavon) dimmers isolated from *Pistacia chinensis* BUNGE and their estrogen-like activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 48: 505-508. 8. Hou AJ, Peng LY, Liu YZ,

AKSOY A., DURAN N and KOKSAL F. (2006). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and *Mutans streptococci*. *Archives Oral Bioology* 51(6); 476-481.

ALI-SHTAYEH M.S and ABU GHDEIB S.I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42: 665–672.

AL-SAGHIR M G. (2006). Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Doctor of Philosophy In Biological Sciences. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.

AL-SAGHIR M.G., PORTER D.M and NILSEN E.T. (2006). Leaf anatomy of *Pistacia lentiscus* species (Anacardiaceae). *Journal of Biological Sciences* 6, 242-244.

AL-SAID M., AGEEL A., PARMAR N and TARIK M (1986). Evaluation of mastic a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Journal Ethnopharmacol* 15, 271-278.

ALYAFI J. (1979). Approche systématique et écologie du genre *Pistacia* L. dans la région Méditerranéenne. Thèse de Docteur de 3ème cycle. Faculté des Sciences et Techniques. ST Jérôme, Marseille P.

ANDERSEN O.M and MARKHAM K.R. (2010). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications, CRC Press : 472–551.

ANDRIKOPOULOS N.K., KALIORA A.C., ASSIMOPOULOU A.N and PAPAGEORGIOU V.P. (2003). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytotherapy Research*. 17: 501–507.

ASSIMOPOULOU A.N., ZLATANOS S.N and PAPAGEORGIOU V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry* 92: 721–727.

ASSIMOPOULOU A.N and PAPAGEORGIOU V.P. (2007). Oleoresins from *Pistacia* species: chemistry and biology. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Siddiqui, N.T., eds. Recent progress in medicinal plants, Vol. 18. Studium Press, LLC, Houston, Texas, pp. 145–202.

ATMANI D., CHAHER N., BERBOUCHA M., AYOUNI K., LOUNIS H., BOUDAUD H., DEBBACHE N and ATMANI D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* 112: 303–309.

AZAIZEH H., LJUBUNCIC P., PORTNAYA I., SAID O., COGAN U and BOMZON A. (2005). Fertilization-induced changes in growth parameters and antioxidant activity of medicinal plants used in traditional Arab medicine. Evidence-based complementary and alternative medicine. *eCAM* 24: 549–556.

B

BALAN K.V., DEMETZOS C., PRINCE J., DIMAS K., CLADARAS M., HAN Z., WYCHE J.H and PANTAZIS, P. (2005). Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, chios mastic gum. *In Vivo* 191 *Spec. Iss.*: 93–102.

BALAN K.V., PRINCE J., HAN Z., DIMAS K., CLADARAS M., WYCHE J.H., SITARAS N.M and PANTAZIS P. (2007). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine* 14: 263–272.

BAMMOU M., DAOUDI A., SLIMANI I., NAJEM M., BOUIAMRINE E.L., IBIJBIJEN J et NASSIRI L. (2015). Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences* 86:7966– 7975.

BARRA A., CORONEO V., DESSI S., CABRAS P and ANGIIONI A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7093–7098.

BARANOWSKA M.A., MARDAROWICZ M., WIWART M., POBLOCKA L and DYNOWSKA L. (2002). Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Naturforsch.* 57, 478-482.

BARAZANI O., DUDAI and GOLAN-GOLDHIRSH A. (2002). Comparison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analysis. *Journal of Chemical Ecology* 29, 1939-1952.

BAYER E., BUTTLER K.P., FINKENZELLER X et GRAU J. (1990). Guide de la flore méditerranéenne .Ed. Delachaux et Nieslé ; p94.

- BAYTOP T. (1999).** Therapy with medicinal plants in turkey- Past and Present, Second ed. Nobel Publishers, Istanbul. *In Durua et al.* 2003
- BELFADEL F.Z. (2009).** Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* : Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques (effet cicatrisant chez le rat). Thèse de Magister en chimie organique. Université MENTOURI. Constantine.
- BENABID A. (2000).** Flore Et Écosystèmes Du Maroc: Évaluation et Préservation De La Biodiversité, Paris: Editions Ibis Press p: 359
- BENDIFALAH L., BENMAHFOUD A.E., HAMENI Y and MAMECHE S. (2014).** Phytochemical study and *in vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. In Boumerdes mountainous region (ALGERIA). *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 1112-9867.
- BENHAMMOU N., BEKKARA F.A., and PANOVSKA T.K. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 2(2). pp. 022-028. IMAMA, Tlemcen (Algeria).
- BENTLEY R.Y et TRIMEN H (1980).** Medicinal plants. In Gardeli et al. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*. pp. 1-11.
- BERBOUCHA M., AYOUNI K., ATMANI D., ATMANI D and BENBOUBETRA M. (2009).** Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Medecinal Food* 13(4); 896-904.
- BHOURI W., DERBEL S., SKANDRANI I., BOUBAKER J., BOUHLEL I and SGHAIER M.B. (2009).** Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*. 24(2); 509-15.
- BIGENAKO-POLYGENIS M.J and LEJOLY J. (1990).** La Pharmacopée Traditionnelle Au Burundi. Pesticides et médicaments en santé animale : 425-442.
- BONSIGNORE L., COTTIGLIA F and LOY G. (1998).** Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* aerial parts. *Fitoterapia*. LXIX (6): 537-538
- BOUHARB H., EL BADAOUI K., ZAIR T., EL AMRI J., CHAKIR S and ALAOUI T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité

antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences* 78:6685 – 6693.

BOULEBDA N., BELKHIRI A., BELFADEL F., BENSEGUENI A and BAHRI L. (2009). Dermal Wound Healing Effect of *Pistacia lentiscus* Fruit's Fatty Oil. *Pharmacognosy Research* 1(2); 66-71.

BRANTERN A., MALES Z., PEPELNJAK S and ANTOLIC A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christ* Mill (christ's thorn). *Journal ethnopharmacol* 52 :119-122.

BROSSE J. (2005). Larousse des arbres : Dictionnaire des arbres et arbustes. Larousse .P 336.

BRUNETON. (2009). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, 4^{ème} ed. Ed Tec & Doc.

C

CORDELL G.A and COLVARD M.D. (2005). Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1-2, pp. 5-14.

COWAN M.M. (1996). Plant Product as Antibacterial Agent. *Clinical microbiology review* 12 (4), 564-582.

Croteau R., Kutchan T.M and Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Eds Buchanan B, Gruissem W, Jones R *American Society of Plant Biologists, Rockville, MD*, pp 1250–1268.

D

DAI J and MUMPER R.J. (2010). Plant phenolic: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. 15(10):7313-52.

DEDOUSSIS G.V.Z., KALIORA A.C., PSARRAS S., CHIOU A., MYLONA A., PAPAPOPOULOS N.G and ANDRIKOPOULOS N.K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* 174: 293–303.

- DELAZAR A., REID R.G and SARKER S.D (2004).** GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chemistry of Natural Compounds* 40 (1): 24-27.
- DE RAYNAL B et MULTON JL. (2009).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaire. Ed Tec & Doc. Lavoisier p517.
- DERWICH E., MANAR A., ZINEB BENZIANE and BOUKIR A. (2010).** GC/MS Analysis and *In vitro* Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* Growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal* 8 (10): 1267-1276.
- DEMO A., PETRAKIS C., KEFALAS P and BOSKOU D. (1998).** Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International*, 31, 351–354.
- DIAZ-BARRADAS M.C and CORREIA O. (1999).** Sexual dimorphism, sex ratio and spatial distribution of male and female shrubs in the dioecous species *Pistacia lentiscus* L. *Folia Geobotanica* 34, 163-174.
- DIMAS K, HATZIANTONIOU S, WYCHE JH, PANTAZIS P. A. (2009).** mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumour xenografts in immunodeficient mice. *In vivo* 23; 63-68.
- DJENANE D., YANGÜELA J., MONTAÑES L., DJERBAL M and RONCALES P. (2010).** Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food control* 22, 1046-1053.
- DOGAN Y., BASLAR S., AYDIN H and MERT H.H. (2003).** A study of the soil-plant interactions of *Pistacia lentiscus* L. distributed in the western Anatolian part of Turkey. *Acta Botanica Croatica*. 62,73-88.
- DOUISSA F.B., HAYDER N., GHEDIRA L.K., HAMMAMI M., GHEDIRA K and MARIOTTE A.N. (2005).** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and fragrance journal*. 20; 410-414.
- DURU M.E., CAKIR A., KORDALI S., ZENGIN H., HARMANDAR M., IZUMI S and HIRATA T. (2003).** Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* 74: 170–176.

E

ENGLER A. (1883). Burseraceae et Anacardiaceae. In A. and C. De Candolle. Monographiae Phanerogamarum. Paris, G. Masson 4 : 284-293.

F

FARNSWORTH N.R., AKERELE O., BINGLE A.S., SOEJARTO D.D., GUOZ. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the world health organization* 63, 965 -981.

FERRADJI A. (2011). Activités antioxydantes et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Magister en Biochimie Appliquée. Université FERHAT Abbas –SETIF.

FLEURENTIN J et PELT J.M. (1990). Les plantes médicinales, la recherche 222 :811-818.

FOTINOS S., PANAITESCU L., KLETSAS D., PLATSINIS H., ZERVOLEA I., SKALTSOUNIS A.L., MITAKOU S and MAGIATIS P. (2003). Use of mastic and its components for the control of microbial infections and proliferative conditions. *United States Patent No 376790P*.

G

GAUSSEN H., LEROY JF et OZENDA P. (1982). Précis de Botanique. Tome II. Les végétaux supérieurs, 579p.

GREISIELE LP, BENEDITO PDF, CELSO VN, DIOGENES and APARICIO GC. (2003). Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 98(8): 1115-1120.

GRUNDWAG M. (1976). Embryology and fruit development in four species of *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 73, 355-370.

GULLUCE M., SOKMEN M., DAFERERA D., AGAR G., OZKAN H., KARTAL N., POLISSIOU M., SOKMEN A and SAHIN F. (2003). *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal Agricultural & Food Chemistry* 51: 3958-3965.

GUPTA V.K., ROY A., NIGAM V.K and MUKHERJEE K. (2010). Antimicrobial Activity of *Spondias Pinnata* Resin. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 1656-1661.

H

HE ML., YUAN HQ., JIANG AL., GONG AY., CHEN WW., ZHANG PJ., YOUNG CYF and ZHANG JY. (2006). Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer* 106: 2547–2555.

HEO C., KIM SW., KIM KJ., KIM DW., KIM HJ., DO JH., CHANG SK. (2006). Protective effects of mastic in non-steroidal anti-inflammatory drug induced gut damage and bacterial translocation in a rat model. *Korean Journal of Medecal* 71: 354–361.

HERNANDEZ NE., TERESCHUK ML and ABDALA LR. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology* 73: 317-322.

I

IAUK L., RAGUSA S., RAPISARDA A., FRANCO S and NICOLOSI VM (1996). *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. *Journal Chemother* 8 (3): 207-20.

IMELOUANE B, AMHAMDI B, WATHELET J.P., ANKIT M., KHEDID K. , EL BACHIRI A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agricultural and Biological*, pp. 205–208.

J

JANAKAT S and AL-MERIE H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia*, and *Nicotiana glauca*. *Journal Ethnopharmacol* 83: 135–138.

JORDANO P. (1989). Polinization yvariabilidad de la produccion de semillas de *Pistacia lentiscus* L. (Anardiaceae). *Anales del Jardin Botanico de Madrid* 45,213-231.

K

KAFKAS S., KAFKAS E and PERL-TREVES R. (2002). Morphological diversity and a germplasm survey of three wild *Pistacia* species in turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 261–70.

KAFKAS S et PERL-TREVES R. (2002). Interspecific relationships in *Pistacia* based on RADP fingerprinting. *HortScience* 37 : 168-171.

KALIORA AC., STATHOPOULOU MG., TRIANTAFILLIDIS JK., DEDOUSSIS GVZ and ANDRIKOPOULOS NK. (2007). Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World Journal Gastroenterol.* 13: 6031–6036.

KOKOWARO J.O et GILLET J.B. (1980). Note on the Anacardiaceae of Eastern Africa. *Kew Bul.* 34, 745-760.

KORDALI S., CAKIR A., ZENGİN H and DURU M.E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia* 74: 164–167.

L

LINNAEUS C. (1753). Species Plantarum. Stockholm, *Laurentii Salvii* 2 : 1025.

LJUBUNCIC P., SONG H., COGAN U., AZAIZEH H and BOMZON A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal Ethnopharmacol* 100: 198–204.

LONGO L., SCARDINO A and VASAPOLLO G. (2007). Identification and Quantification of Anthocanins in The Berries of *Pistacia lentiscus* L. *Elsevier, Italy. Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 360–364.

M

MAGIATIS P., MELLIYOU E., SOUNIS A.L.S., CHINOUBI and MITAKU S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta medica* 65(8); 749-752.

MORE D et WHITE J. (2005). Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, pp 18 ; 797.

MUNNE-BOSCH S and PENUÉLAS J. (2003). Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. Grown under Mediterranean field conditions.

N

NAHIDA S.H., ANSARI A.N and SIDDIQUI. (2012). *Pistacia lentiscus*: A Review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 4, Suppl 4. 0975-1491.

O

OUARAB et SEHIL. (2012). Evaluation de l'effet antibactérien d'extraits éthanolique de feuilles de lentisque (*Pistacia lentiscus*) récoltées de quatre régions de la wilaya de Tizi-Ouzou. Ingéniorat en Contrôle de la Qualité Alimentaire. Université Mouloud MAMMERI. Tizi-Ouzou.

OUSSOU K.R., KANKO C., GUESSEND N., YOLOU S., KOUKOUA G., DOSSO M., GUESSAN Y.T.N., FIGUEREDO G and CHALCHAT J.C. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. C.R. *Chimie 7* : 1081-1086.

ÖZEKER E., ISEFENDIYAROGLU M and MISIRLI A. (2006). Comparaison of different *Pistacia spp* in terms of pollination biology in the Yunt Mountains of Manisa Province in Turkey. *Pakistan Journal Biological Science.* 9, 371-376.

P

PARFITT D E and BADENES M L. (1997). Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 7987-7992.

POOTER H.L., SCHAMP N.M., TOHAMY A.S.F and DOSS S.L (1991). Essential oil of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt, *Flavour and Fragrance Journal* **6**, 229-232.

PRASAD R and KAPOOR K. (2004). Multidrug resistance in yeast *Candida-Int.* *Review Cytology* 242 : 215-248.

Q

QUEZEL P et MEDAIL F. (2003). Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen, *Elsevier Edition.* 571pp.

R

RANT W, BROPHY JJ, SARAFIS and HOBBS M. (1990). Volatile components of the fruit *Pistacia lentiscus*. *Journal Food Sciennce* 55: 1325-1326.

RAYNE S et MAZZA G (2007). Biological Activities of Extracts from Sumac (*Rhus spp.*): A Review .Volume 62, Issue 4, pp 165-175.

S

SADEK. (2002). Solvent Miscibility and Viscosity Chart adapted from The HPLC Solvent Guide Wiley-Interscience.

SEIGUE, A., (1985). La foret Circumméditerranéen et ses Problèmes, Maisonneuve & Larose,pp 22-27, pp 137-139.

SHAN L., HE P and SHEEN J. (2007). Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe* 1, 167–174.

SMAIL-SAADOUN N. (2002). Types stomatiques du genre *Pistacia lentiscus* : *Pistacia atlantica*. Desf.ssp.*atlantica* et *Pistacia lentiscus* L. p369.

SQALLI H E.L OUARTI A., ENNABILI A., IBNSOUDA S., FARAH A., HAGGOUD A., HOUARI A and IRAQUI M. (2007). Évaluation de l'effet Antimycobactérien de Plantes du Centre-Nord du Maroc. *Bulletin de la Société de Pharmacie* 146, 271-288.

STERN J.L., HAGERMAN A.E., STEINBERG P.D and MASON P.K. (1996). Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22 p 1887-1899.

T

TASSOU CH.CH and NYCHAS G-J.E. (1995). Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model Food system. *Letters in Applied Microbiology* 20, 120-124.

TATTINI M., REMORINI D., PINELLI P., AGATI G., SARACINI E., TRAVERSI M.L and MASSAI R. (2006). Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist* 170: 779–793.

TYLER V.E. (1999). Phytomedicines: back to the future. *J. Nat. Prod.* 62, 1589-1592.

TRIAANTAFYLLOU A., CHAVIARAS N., SERGENTANIS T.N., PROTOPAPA E and TSAKNIS J. (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacol* 111: 43–49.

V

VERDU M and GARCIA-FAYOS P. (1998). Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Canadian Journal of Botany*. 76, 134-141.

VERDU M and GARCIA-FAYOS P. (2002). Reproduction ecology of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): an evolutionary anachronism in the Mediterranean shrubland. *Revista Chilina Historia Natural* 75, 57-65.

VILLAR A., SANZ M.J and PAYA M. (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *International journal of crude drug research* 25(1): 1-3.

Z

ZOHARY. (1952). A monographic study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany* 5, 187-228.

Annexe

Matériel de laboratoire utilisé :

Agitateur : Heidolph Rotamax 120 Germany
Agitateur magnétique : gerhargt Germany
Autoclave : Nüve Bruxelles
Bain marie : Nüve (bath) Bruxelles
Balance de précision : Kern PCB Germany
Cryotubes
Etuve bactériologique : Melag Germany
Etuve de séchage des extraits : Memmert Germany
Four Pasteur: Melag Germany
Microscope optique: Hand Wetzlar Germany
Moulin à café : Moulinex France
Papier Wattman N°1
Sonicateur: Bandelin Sonorex Germany
Spectrophotomètre : Medline Unated Kingdom
Vortex : TechnoKartell Australie

Composition des différents milieux de cultures utilisés :

Eau physiologique :

NaCl09g
Eau distillée..... 1000 ml

Milieu BCP

Peptone..... 5g
Extrait de viande..... 3g
Lactose..... 10g
Agar Agar.....15g

Eau distillée..... 1000ml

pH 7

Milieu BEA

Peptone.....17g

Peptone pepsique de viande.....3g

Extrait de levure.....5g

Esculine.....1g

Citrate de sodium.....1g

Citrate de fer ammoniacal.....0,5g

Bile de bœuf déshydratée.....10g

Azide de sodium.....025g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....13g

pH 7,1

Bouillon BHIB

Protéose peptone..... 10g

Infusion de cervelle de veau.....12,5 g

Infusion de cœur de bœuf05g

Chlorure de sodium..... 5g

Phosphate disodique.....2, 5g

Glucose..... 2g

Eau distillée.....1000 ml

pH final 7,4±0,2

Gélose nutritive

Extrait de viande..... 5g

Peptone..... 10g

Chlorure de sodium..... 5g

Agar..... 15g

pH 7,2

Milieu Chapman

Extrait de viande.....1g

Peptone de caséine et de viande.....10g

Chlorure de sodium.....5g

D-mannitol.....10g

Agar 15g

Rouge de phénol.....0,025g

Eau distillées..... 1000ml

pH final 7,4±0,2

Muller Hinton :

Extrait de viande.....03g

Hydrolysat acide de caséine 17,5g

Amidon..... 1,5g

Agar..... 16g

Eau distillée..... 1000 ml

pH final 7,3

Mueller Hinton (bouillon oxoid)

Infusion de viande300g

Hydrolysat de caséine..... 17,5g

Amidon..... 1,5g

pH±0,2

Rouge de phénol

Rouge de phénol..... 0,1g
Eau distillée..... 10ml

Milieux de la galerie biochimique

Citrate simmons

Clarck et Lubs :

- A-naphtol
- NaOH

Eau peptonée exempte d'indole

Nitrate réductase

- Acide sulfanique
- A-naphtylamine

Mannitol mobilité

Triple Sugar Iron

Urée indole

Réactifs de la coloration de Gram

Alcool

Fuchsine

Lugol

Violet de Gentiane